

· 论 著 ·

人肺腺癌细胞系 A549 与正常支气管上皮细胞系 HBE 的比较蛋白质组学研究*

段 东¹, 李少林², 朱玉泉¹, 王树兵²

(1. 重庆医科大学第一附属医院核医学科 400016; 2. 重庆医科大学基础医学院核医学教研室 400016)

摘要:目的 利用蛋白质组学技术建立人肺腺癌细胞系 A549 与正常支气管上皮细胞系 HBE 的差异蛋白质表达谱,并对部分在 A549 细胞中表达明显上调的蛋白质点进行鉴定。方法 提取 A549 和 HBE 细胞的总蛋白,进行双向凝胶电泳(2-DE),经图像分析识别差异表达蛋白质点,再应用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)鉴定出部份在 A549 细胞中表达明显上调的蛋白质。结果 (1)分析两种细胞系的 2-DE 图谱,发现差异表达蛋白质点共 256 个,仅在 A549 细胞中表达的蛋白质点 15 个,仅在 HBE 细胞中表达的蛋白质点 21 个;(2)通过肽质量指纹图谱分析鉴定出在 A549 细胞中表达明显上调的 7 种蛋白质,分别是表皮生长因子受体(EGFR)、鼠双微粒体 2 蛋白(MDM2)蛋白、CD44 蛋白、细胞骨架蛋白细胞角蛋白 8(CK8)、不均一性核糖体蛋白 H(hnRNP H)、热休克蛋白 60(HSP60)、磷酸甘油酸变位酶 1(PGAM1)。结论 运用蛋白质组学技术成功获得了 A549 细胞与 HBE 细胞的 2-DE 图谱,并鉴定出部分在 A549 细胞中表达明显上调的蛋白质,为进一步筛选用于人肺腺癌诊断、治疗及预后评估的分子标志物奠定了一定的基础。

关键词: 肺肿瘤; 蛋白质组学; 电泳, 凝胶, 双向

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.34.003

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)34-3439-03

A comparative proteomics research on human pulmonary adenocarcinoma cell line

A549 and normal human bronchial epithelial cell line HBE*

Duan Dong¹, Li Shaolin², Zhu Yuquan¹, Wang Shubing²

(1. Department of Nuclear Medicine, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;

2. Department of Nuclear Medicine, Basic Medical College, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To establish differential protein expression profile of human lung adenocarcinoma cell line A549 and normal human bronchial epithelial cell line HBE using proteomics technology, and to identify some of the protein spots whose expression were up-regulated obviously in A549 cells. **Methods** Total protein of A549 and HBE cells were extracted and subjected to two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis(2-DE). The differentially expressed protein spots were recognized by image analysis, and then the matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry(MALDI-TOF-MS) was employed to identify proteins whose expression were up-regulated obviously in A549 cells. **Results** (1) Comparatively analyzing the 2-DE protein patterns of the two types of cell lines, a total of 256 differentially expressed protein spots were found, with 15 spots differentially expressed only in A549 cells and 21 spots only in HBE cells. (2) 7 kinds of protein including epidermal growth factor receptor (EGFR), murine double minute 2 (MDM2), CD44, cytokeratin 8(CK8), heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H (hnRNPs H), heat shock protein 60 (HSP60) and phosphoglycerate mutase 1(PGAM1), were identified by peptide mass fingerprintin, and their expression were obviously up-regulated in A549 cells. **Conclusion** 2-DE protein patterns of A549 and HBE cells are successfully obtained by proteomic technology, and some of the proteins whose expression were up-regulated obviously in A549 cells are identified. These lay a foundation for further screening of molecular diagnostic, treatment and prognostic markers of lung cancer.

Key words: lung neoplasms; proteomics; electrophoresis, gel, two-dimensional

肺癌是目前全球范围内发病率和病死率均较高的恶性肿瘤之一^[1],尤其是近年来我国肺癌的发病率和病死率均呈迅速上升的趋势。对肺癌发生、发展的分子机制,早期诊断、治疗靶标的筛选及预后的判断等具有重要研究意义。蛋白质组学技术以机体(特定组织或细胞)的全部表达蛋白质为研究对象,对阐释肿瘤发生、发展的分子机制,寻找肿瘤特异性标志物、确定新的药物治疗靶点,实现肿瘤的早期诊断、早期治疗方面具有广阔的应用前景^[2]。本研究报道对肺腺癌细胞系 A549 与正常支气管上皮细胞系 HBE 的比较蛋白质组学研究结果。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞系 人肺腺癌细胞系 A549 细胞由本校病理生理教研室馈赠,人正常支气管上皮细胞系 HBE 购自上海天星科技有限公司。两种细胞系均用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液传代培养。

1.1.2 主要试剂及仪器 小牛血清、RPMI-1640 培养基(美国 Gibco BRL);二喹啉甲酸、二硫苏糖醇(DTT)、碘乙酰胺、双向凝胶电泳标准蛋白质、甲苯磺酰苯丙氨酸酰氯甲-酮-胰蛋白酶(Sigma 公司);琼脂糖、溴芬蓝、(胆酰胺丙基)二甲氨基-1-丙磺酸(CHAPS)、低分子量标准蛋白、固相 pH 梯度干胶条(IPG strip, pH 3-10, 18 cm)、IPG 缓冲液、两性电解质(Ampholyte, pH 3-10)、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、甘氨酸、三羟甲基氨基

* 基金项目:国家自然科学基金项目资助课题(30570523)。

甲烷(Tris)、四甲基乙二胺(TEMED)、尿素、十二烷基硫酸钠(SDS)及蛋白银染试剂(美国 Bio-Rad 公司);硝酸银(AgNO_3)、甲醛、甘油、硫代硫酸钠($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)等其他试剂均为国产分析纯,乙腈(CAN)为国产色谱纯。IPGphor 等电聚焦仪、垂直板电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);光学扫描仪、ImageMaster 2D Elite 5.01 凝胶图像分析软件(瑞典 Amersham Pharmacia Biotech 公司);MALDI-TOF-MS 质谱仪(美国 ABI 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞总蛋白的提取 用含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基传代培养 A549 细胞及 HBE 细胞,待细胞生长至对数生长期后吸出培养液,用胰酶消化。细胞经预冷磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗数秒,室温下离心,1 500 r/min,10 min,弃上清,重复 3 次。加入约 5 倍体积的细胞裂解缓冲液(8 mol/L 尿素,4% CHAPS,40 mmol/L Tris-base,40 mmol/LDTT,0.5% Ampholyte pH 3~10),混匀,在 4 °C 下静置 30 min。加 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 核糖核酸酶(Rnase)及 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 脱氧核糖核酸酶(Dnase),在 4 °C 放置 15 min。4 °C 下离心,15 000 r/min,60 min,收集上清液,采用 Bradford 法测细胞总蛋白浓度,并冻存于 -80 °C 冰箱备用。

1.2.2 固相 pH 梯度双向凝胶电泳及凝胶的银染显色 (1)固相 pH 梯度等电聚焦电泳:参照 IPGphor 等电聚焦系统使用指南进行。一向电泳上样总体积为 100 μL (约 150 μg 总蛋白)。电泳条件为:30 V 低电压水化 16 h,后经 500 V 1 h、1 000 V 1 h、8 000 V 8.5 h 进行等电聚焦,总电压时间为 68 000 Vh。(2)十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE):配制 12% 的丙烯酰胺凝胶 6 块,分别取平衡后的 IPG 胶条(两种细胞各 3 根胶条)移至凝胶的上端,并在一端加入蛋白质标准品,尽可能排尽气泡后,用含痕量溴酚蓝的低熔点琼脂糖封胶,进行 SDS-PAGE 电泳:起始时用低电流[5 mA \cdot gel $^{-1}$ \cdot (18 cm) $^{-1}$]或低电压,待样品完全走出 IPG 胶条,浓缩成一条线后,再加大电流[20~30 mA \cdot gel $^{-1}$ \cdot (18 cm) $^{-1}$]或高电压,待溴酚蓝指示剂达到底部边缘时即可停止电泳。(3)双向电泳结束后,取出凝胶,并做好标记,进行银染显色(参照蛋白质银染试剂盒操作说明进行)。

1.2.3 凝胶图像分析与质谱分析 用光学扫描仪扫描染色后的凝胶,光学分辨率为 300 ppi(每英寸像素)。采用 ImageMaster 2D Elite 5.01 凝胶图像分析软件对扫描图像进行分析,包括蛋白质斑点位置坐标确定、背景消减、2D 校正,匹配、量化获取斑点的相关信息等。对 A549 细胞和 HBE 细胞的总蛋白质样品 3 次双向电泳的凝胶图谱分析,各选择一张蛋白质

点清晰、背景好的图像作为参考胶,与组内其他两次实验的图像进行匹配,然后以同种细胞 3 次电泳所得的蛋白质点图谱在软件中创建平均胶。再以 HBE 细胞的平均胶为参照胶,与 A549 细胞的平均胶进行两两匹配,从 ImageMaster 分析软件中导出两组细胞蛋白质点的数据,包括蛋白质点序号、匹配与否、等电点、相对分子质量、相对含量等,寻找两种细胞间的差异表达蛋白质点,采集细胞间差异表达的蛋白质点图像。选择 9 个在 A549 细胞中表达量明显上调(较 HBE 中表达量高 5 倍以上),且背景清晰、分辨清楚、蛋白含量高、重复性较好的蛋白质点,做好标记后进行质谱分析,获得各差异蛋白质点肽质量指纹图。

1.2.4 数据库查询 采用 ExPASy 在中国的镜像站点(<http://cn.expasy.com>)的 Peptident 软件搜索数据库。搜索条件为:肽质量控制在 800~4 000,表观等电点(pI)的误差范围为 1 pH,表观分子量(MW)的误差为 20%,肽片段质量最大误差控制在 100 ppm,酶解片段不完全选择为 2 个,物种来源为人类,最少匹配片段数为 4,选择片段信号为基线的 1 倍以上的肽质量峰。

2 结果

2.1 两种细胞系的总蛋白 2-DE 图谱 细胞系 A549 与 HBE 的总蛋白 2-DE 图谱见图 1、2。在相同的条件下对两种细胞系均进行了 3 次重复性 2-DE 检测。通过 ImageMaster 2D Elite 5.01 凝胶图像分析软件对 3 次实验的图谱分析后显示,两种细胞三块胶的平均蛋白质点数分别为(897 \pm 35)个及(882 \pm 29)个。两种细胞各选择一块参考胶进行匹配,A549 和 HBE 细胞的平均匹配点数分别为 778 \pm 21、765 \pm 18,匹配率分别为 87.2%和 86.5%。选择每种细胞的三块胶上匹配且分辨清楚的蛋白质点 100 个,测出其他两块胶蛋白质点相对于参考胶上对应点的 IEF 和 SDS-PAGE 方向上的位移,计算三块胶的位置重复性,结果显示:A549 和 HBE 细胞的不同蛋白质点在 IEF 方向的偏差分别为 0.95 \pm 0.11、0.99 \pm 0.15,SDS-PAGE 方向的偏差分别为 1.18 \pm 0.19、1.21 \pm 0.20,说明两种细胞的三块胶上蛋白质点均有较好的重复性。

以 HBE 细胞的平均胶为参照胶,将其与 A549 细胞的平均胶进行匹配,匹配率为 82.3%。将 A549 细胞和 HBE 细胞的平均胶相互匹配后,从 ImageMaster 分析软件中导出两株细胞的蛋白质点数据,运用 SPSS11.0 和 Microsoft Excel 2000 分析所得的数据,结果显示:两种细胞中差异表达蛋白质点共 256 个,其中仅在 A549 细胞中表达的蛋白质点 15 个,仅在 HBE 细胞中表达的蛋白质点 21 个。

表 1 人肺腺癌 A549 细胞 2-DE 凝胶部分蛋白质点鉴定结果

质谱蛋白质点编号	在 Swissprot 数据库中蛋白质的编号	匹配肽段的数量	与已知蛋白肽段的符合率(%)	匹配蛋白的理论相对分子质量和等电点	Swissprot 数据库中匹配蛋白的名称
1	P00533	39	44	138 277/6.26	EGFR
2	Q00987	15	52	75 233/4.60	MDM2
4	P05787	17	48	53 572/ 5.52	CK8
5	P10809	12	33	57 962/ 5.23	HSP60
6	P31943	12	45	49 098/ 5.89	hnRNP H
7	P16070	16	40	79 226/5.10	CD44
9	P18169	10	55	28 804/6.67	PGAM1

2.2 差异表达蛋白质点的 MALDI-TOF-MS 分析及数据库查询 对 9 个在 A549 细胞凝胶图中表达明显上调(与在 HBE 细胞中的表达量差异在 5 倍以上)蛋白质点进行 MALDI-TOF-MS 分析,获得各蛋白质点的肽质量指纹图(PMF)。利用 ExPASy 中的 Peptide 查询软件应用上述的 PMF 数据搜索 SWISS-PROT 数据库,结果未搜索到匹配的蛋白质 2 个,另 7 个蛋白质点匹配的蛋白质分别为表皮生长因子受体(EGFR)、鼠双微体 2 蛋白(MDM2)、CD44 蛋白、细胞骨架蛋白 CK8、不均一性核糖体蛋白 H(hnRNP H)、热休克蛋白 60(HSP60)、磷酸甘油酸变位酶 1(PGAM1)。7 个蛋白质点质谱鉴定结果见表 1。

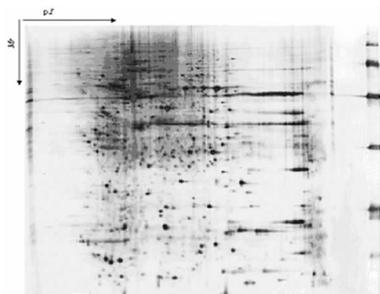


图 1 人肺腺癌细胞系 A549 细胞总蛋白双向电泳图谱

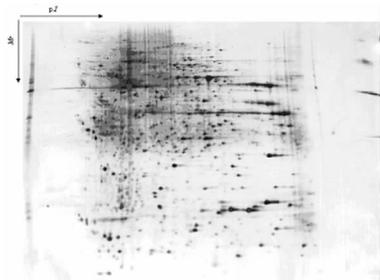


图 2 人正常支气管上皮细胞系 HBE 细胞总蛋白双向电泳图谱

3 讨论

蛋白质组学技术已成为当前探讨肿瘤发病机制、寻找肿瘤特异性标志物等最有效的策略之一。由于肿瘤细胞系样品制备相对容易,并在膜蛋白、信号传导通路及分泌蛋白等的研究中具有较大的优势,其已成为蛋白质组学良好的研究模型^[3]。本实验严格按照双向凝胶电泳操作规程并尽量优化凝胶图像分析条件,得到了较理想的 2-DE 图谱,通过图像扫描及软件分析,A549 和 HBE 细胞各三块胶的平均蛋白质点数分别为(897±35)个及(882±29)个,两种细胞各选择一块参考胶进行匹配,平均匹配点数分别为 778±21、765±18,匹配率分别达到 87.2%和 86.5%,提示获得了重复性较好的 2-DE 图谱。

本研究通过 ImageMaster 2D Elite 5.01 凝胶图像分析软件结合肉眼观察,对 A549 细胞和 HBE 细胞的平均胶对比分析,两种细胞中差异表达蛋白质点共 256 个,其中仅在 A549 细胞中表达的蛋白质点 15 个,仅在 HBE 细胞中表达的蛋白质点 21 个。本研究共选择了 9 个在 A549 细胞中表达明显上调(与在 HBE 细胞中的表达量差异在 5 倍以上),且背景清晰、重复性较好的蛋白质点进行质谱分析,初步鉴定了 7 种蛋白质,分别是:EGFR、MDM2 蛋白、CD44 蛋白、细胞骨架蛋白 CK8、hnRNP H、HSP60、PGAM1。根据功能不同,这些蛋白质可分为信号传导分子、细胞骨架蛋白、转录及翻译相关蛋白、分子伴侣、基本代谢相关的酶类。

EGFR 是一种细胞膜表面的糖蛋白受体,是原癌基因 C-

erb-1(HER-1)的表达产物,其与配体 EGF 结合后可激活自身酪氨酸激酶的活性,刺激细胞内 DNA 的合成,引起细胞的增殖、分化。研究表明,多种肿瘤中存在 EGFR 信号传导的失调,其高表达对促进肿瘤细胞的增殖、肿瘤血管的形成、黏附、侵袭、转移和肿瘤细胞的凋亡等具有重要作用^[4]。MDM2 蛋白是位于细胞核内的一种高度酸性的蛋白质,研究显示,MDM2 蛋白表达增高,可通过与 P53 蛋白结合,使后者功能被抑制或被降解灭活,从而使肿瘤细胞逃脱 P53 蛋白的调节生长和控制作用,导致细胞异常增生与增殖^[5]。CD44 蛋白是属黏附分子家族的一种跨膜糖蛋白,广泛存在于细胞膜的表面,其能与多种配体结合决定了其功能的多样性,包括细胞黏附、信号传导、参与淋巴细胞功能、参与造血等,但更主要的是在肿瘤的生长、转移等方面具有重要作用^[6]。本实验中,EGFR、MDM2 蛋白、CD44 蛋白在 A549 细胞中高表达,说明该他们在肺癌的异常增殖、浸润性生长、转移方面可能扮演重要角色。

细胞骨架(cytoskeleton)具有决定和维持细胞形态、对细胞器和细胞质中的蛋白质进行空间组织及参与细胞运动、分裂、胞浆运输等功能,是目前抗癌药物治疗的靶点之一。CK8 是细胞骨架的重要成分,报道显示^[7],在耐药的卵巢癌细胞中, β -链微管蛋白表达明显上调,推测该蛋白过表达可能是紫杉特尔三种耐药机制中最重要的一种。分子伴侣能抑制细胞内蛋白降解,帮助蛋白质正确折叠,能调节蛋白分泌、细胞运动、基因表达,还参与细胞周期、细胞凋亡和分化等调控。研究发现,HSP60 及 HSP β -1 等可能与癌细胞对化疗、放疗抵抗有关^[8]。本研究中 CK8 和 HSP60 在肺癌 A549 细胞中高表达,推测两种蛋白可能在肺癌的耐药机制中发挥一定的作用。

hnRNP H 是一类 RNA 结合蛋白,与 RNA 的拼接、端粒酶 DNA 序列的调节、细胞周期调控、mRNA 由细胞核到胞质的转运及细胞分裂、分化、凋亡等密切相关。有报道显示,和正常组织相比,hnRNP H 在原发及转移性头颈部肿瘤组织中表达明显上调,提示该蛋白有望成为肿瘤标志物^[9]。本研究中,hnRNP H 在肺癌 A549 细胞明显高表达,说明该蛋白在肺癌中可能是一种极有研究潜力的肿瘤标志物。PAGM1 属与基本代谢相关的酶类,催化糖酵解途径中 2-磷酸甘油酸转变为 3-磷酸甘油酸的可逆反应。研究显示,PAGM1 在多种肿瘤中表达均明显增高,且高转移能力的肿瘤细胞中 PAGM1 的表达明显高于低转移能力的肿瘤细胞,可能是因为在转移过程中,肿瘤细胞大量增殖,无氧糖酵解旺盛,因此其含量增高,活性增强^[10]。本研究中,PAGM1 在肺癌 A549 细胞明显高表达,说明该蛋白可能在肺癌的侵袭性生长、转移等具有重要的作用。

参考文献:

- [1] Rom WN, Hay JG, Lee TC, et al. Molecular and genetic aspects of lung cancer[J]. Am J Respir CR IT Care Med, 2000,16(4 Pt 1):1355-1367.
- [2] Parikh AA, Johnson JC, Merchant NB, et al. Genomics and proteomics in predicting cancer outcomes[J]. Surg Oncol Clin N Am, 2008,7(2):257-277.
- [3] Hanash SM, Bobek MP, Grigman DS, et al. Integrating cancer genomics and proteomics in the post-genome era[J]. Proteomics, 2002,1(1):69-75.
- [4] Kumar A, Petri ET, Halmos B, et al. Structure and clinical relevance of the epidermal growth factor receptor in human cancer[J]. J Clin Oncol, 2008,26(10):1742-1751. (下转第 3444 页)

究发现,下调 Livin 表达后,食管癌细胞周期重新分布, G_0/G_1 期细胞增加,S 期细胞减少,顺铂联合 RNA 干扰则可将细胞更多地阻滞于 S 期。本实验中, RNA 干扰 Livin 后,细胞由 G_0/G_1 期向 S 期发展的能力以及 DNA 的合成受到抑制,最终导致了细胞增殖的减少。

本研究用 TUNEL 法检测细胞的凋亡情况,发现典型的凋亡细胞形态学发生明显改变:细胞变小、变圆、细胞核固缩;而正常细胞的细胞核不着染。食管癌细胞中 Livin 下调后,细胞的凋亡率明显上升,提示它有诱导细胞凋亡的作用。判别细胞凋亡的金标准是电镜观察。TEM 观察发现 RNA 干扰 Livin 后的细胞出现典型的凋亡特征,这就进一步证实了 Livin 的下调可以诱导食管癌细胞自发的发生凋亡。本研究将 Livin 基因沉默后比较了干扰组和阴性对照组细胞的化疗敏感性。结果发现,联合组的细胞凋亡率显著高于阴性对照组和顺铂组的细胞。这提示靶向 Livin 的 RNA 干扰可能会增强食管癌对于顺铂化疗的敏感性及降低顺铂使用剂量,从而减少化疗过程中不良反应的发生。提示靶向 Livin 的 RNA 干扰,对化疗药物治疗食管癌可能起到辅助作用。

Caspase 是一组半胱氨酸蛋白酶家族,是介导细胞凋亡的重要蛋白家族,大多数刺激物是通过 Caspase 蛋白的级联激活反应引起细胞凋亡。本研究结果表明, Livin 表达下降后, Caspase-3 的表达随之升高,提示 Livin 靶向 RNA 干扰后可能通过减少了杆状病毒 IAP 重复序列(BIR 序列)与 Caspase-3 结合,导致 Caspase-3 升高、活性增加而最终导致食管癌细胞的凋亡增加。在本研究中,同样发现 Livin 靶向 RNA 干扰后,也增加了 Caspase-9 的表达,提示 Caspase-9 同样也参与了 Livin 所介导的食管癌细胞的凋亡。Nachmias 等^[13]也发现, Livin 可以和 Caspase-9 结合,在凋亡的起始阶段起抗凋亡作用。本研究的结果与前期的报道相符,说明 Caspase-3、Caspase-9 在 Livin 调控食管癌细胞凋亡的通路中,发挥着重要的作用。

综上所述,本实验构建的靶向 Livin 的 siRNA 可以有效地抑制 Livin 基因的表达,并通过上调 Caspase-3、Caspase-9 的表达,从而达到抑制食管癌细胞增殖,诱导细胞凋亡的作用。Livin siRNA 对顺铂治疗食管癌可起到辅助作用,为提高临床食管癌治疗效果奠定了一定的实验基础。在以后的研究中,还需要用更多种类的化疗药物和食管癌细胞,以进一步分析 Livin 靶向 RNA 干扰与化疗敏感性之间的关系。

参考文献:

[1] Liu B, Han M, Wen JK, et al. Livin/ML-IAP as a new target for cancer treatment [J]. *Cancer Lett*, 2007, 250 (2):168-176.

(上接第 3441 页)

[5] Yang B, Sun LJ, Ming ZQ, et al. The expression of P53, MDM2 proteins and the correlation in cervical cancer [J]. *Guizhou MED J*, 2007, 31(1):1-3.

[6] Matusan K, Dordevic K, Mozetic V, et al. Expression of osteopontin and CD44 molecule in papillary renal cell tumors [J]. *Pathol Oncol Res*, 2005, 11(2):108-113.

[7] Mozzetti S, Ferlini C, Concolino P, et al. Class III beta tubulin overexpression is a prominent mechanism of paclitaxel resistance in ovarian cancer patients [J]. *Clin cancer Res*, 2005, 11(1):298-305.

[8] Kim CH, Kim DK, Choi SJ, et al. Proteomic and transcrip-

[2] Choi J, Hwang YK, Sung KW, et al. Expression of Livin, an antiapoptotic protein, is an independent favorable prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. *Blood*, 2007, 109(2):471-477.

[3] Yagihashi A, Ohmura T, Asanuma K, et al. Detection of autoantibodies to survivin and livin in sera from patients with breast cancer [J]. *Clin Chim Acta*, 2005, 362(1/2):125-130.

[4] Hariu H, Hirohashi Y, Torigoe T, et al. Aberrant expression and potency as a cancer immunotherapy target of inhibitor of apoptosis protein family, Livin/ML-IAP in lung cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(3):1000-1009.

[5] Crnkovic-Mertens I, Muley T, Meister M, et al. The antiapoptotic livin gene is an important determinant for the apoptotic resistance of non-small cell lung cancer cells [J]. *Lung Cancer*, 2006, 54(2):135-142.

[6] Crnkovic-Mertens I, Wagener N, Semzow J, et al. Targeted inhibition of Livin resensitizes renal cancer cells towards apoptosis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2007, 64(9):1137-1144.

[7] Watanabe M, Nagai Y, Kinoshita K, et al. Induction chemotherapy with docetaxel/ cisplatin/5-fluorouracil for patients with node-positive esophageal cancer [J]. *Digestion*, 2011, 83(3):146-152.

[8] Okines A, Sharma B, Cunningham D. Perioperative management of esophageal cancer [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2010, 7(4):231-238.

[9] Di Cosimo S, Baselga J. Targeted therapies in breast cancer: where are we now [J]. *Eur J Cancer*, 2008, 44(18):2781-2790.

[10] Fulda S. Tumor resistance to apoptosis [J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(3):511-515.

[11] Syrigos KN, Zalonis A, Kotteas E, et al. Targeted therapy for oesophageal cancer: an overview [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2008, 27(2):273-288.

[12] Chang H, Schimmer AD. Livin/ melanoma inhibitor of apoptosis protein as a potential therapeutic target for the treatment of malignancy [J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(1):24-30.

[13] Nachmias B, Ashhab Y, Bucholtz V, et al. Caspase-mediated cleavage converts Livin from an antiapoptotic to a proapoptotic factor: implications for drug-resistant melanoma [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(19):6340-6349.

(收稿日期:2011-05-09 修回日期:2011-07-12)

tomics analysis of interleukin-1 beta treated lung carcinoma cell line [J]. *Proteomics*, 2003, 3(12):2454-2471.

[9] Rauch J, Ahlemann M, Schaffrik M, et al. Allogenic antibody-mediated identification of head and neck cancer antigens [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 323(1):156-162.

[10] Evans MJ, Saghatelian A, Sorensen EJ. Target discovery in small-molecule cell-based screens by in situ proteome reactivity profiling [J]. *Nat Biotechnol*, 2005, 23(10):1303-1307.

(收稿日期:2011-04-09 修回日期:2011-09-12)