

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.10.001

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.10.001

· 论著 ·

利用蛋白质组学筛选肾透明细胞癌肿瘤标志物

郭丹^{1,2*}, 王安琪^{1*}, 赵晓晓¹, 刘辉³, 孙健^{1,4}

(中国医学科学院 1. 北京协和医院临床生物标本中心; 2. 北京协和医院中心实验室;
3. 基础医学研究所; 4. 北京协和医院病理科, 北京 100730)

[摘要] 目的: 通过蛋白质组学筛选和验证肾透明细胞癌中潜在肿瘤标志物。方法: 采用比较蛋白质组学方法筛选正常肾组织和肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)组织中的差异表达蛋白, 通过二维差异凝胶电泳(two-dimensional difference gel electrophoresis, 2D-DIGE)和傅里叶变换离子回旋共振质谱(Q-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, FT-ICR MS)分离并鉴定16例RCC组织及其相应的正常组织中差异显著的蛋白, 并进一步通过实时荧光定量PCR(real-time quantitative PCR, qRT-PCR)、Western印迹和免疫组织化学在RNA和蛋白水平进行验证。结果: 通过2D-DIGE共筛选出1 873个蛋白质点, 选取68个表达差异大于1.5倍的蛋白质点进行鉴定, 成功鉴定出51个蛋白质($P<0.05$), 其中16个蛋白表达上调, 35个表达下调。采用qRT-PCR和Western印迹验证16例肿瘤和对照组织, 结果表明在肿瘤组织中NNMT和Annexin IV表达显著升高, 而ACY1和Calbindin显著下调($P<0.01$)。同时针对ACY1和Annexin IV蛋白分别在53例和47例样本中进行免疫组织化学, 结果显示相较于对照组织, ACY1在肾透明细胞癌中表达显著降低($P<0.001$), 而Annexin IV显著升高($P<0.001$)。结论: ACY1和Annexin IV可作为肾透明细胞癌的肿瘤标志物。

[关键词] 肾透明细胞癌; 肿瘤标志物; 蛋白质组学; 二维差异凝胶电泳

Potential tumor markers of renal clear cell carcinoma with proteomic

GUO Dan^{1,2*}, WANG Anqi^{1*}, ZHAO Xiaoxiao¹, LIU Hui³, SUN Jian^{1,4}

(1. Clinical Biobank, Peking Union Medical College Hospital; 2. Corelabs, Peking Union Medical College Hospital; 3. Corelabs; 4. Department of Pathology, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China)

Abstract **Objective:** To identify and validate the potential tumor markers of renal clear cell carcinoma for progress assessment and clinical treatment with proteomic. **Methods:** We analyzed 16 cases of tumor and pericarcinomatous tissue with two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) and Q-Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FT-ICR MS), and then identified the abnormal

* 为共同第一作者

收稿日期 (Date of reception): 2017-08-10

通信作者 (Corresponding author): 孙健, Email: sunjian0720@126.com

基金项目 (Foundation item): 国家科技重大专项 (2011ZX09307-001-01); 国家重点研发计划 (2016YFC1201703)。This work was supported by National Science and Technology Major Project Foundation (2011ZX09307-001-01) and the National Key Research and Development Program (2016YFC1201703), China.

expression protein with Western blot, Real-time quantitative PCR and IHC. **Results:** A total of 1 873 proteins were quantified with proteomic in 16 cases of renal clear cell carcinoma, and 51 proteins of 68 spots that more than 1.5-fold differential expressing were identified, including 16 proteins upregulated and 35 proteins downregulated in renal cell carcinoma (RCC) ($P < 0.05$). Among them, the up-expressed NNMT, Annexin IV and down-expressed ACY1, calbindin in DIGE were confirmed with 16 cases of tumor and pericarcinomatous tissues with qRT-PCR and Western blot ($P < 0.01$). Subsequently, SPSS analysis of IHC validated ACY1 decreased in 53 cases of clear cell renal cell carcinoma ($P < 0.001$), and Annexin IV increased in 47 cases ($P < 0.001$). **Conclusion:** ACY1 and Annexin IV serve as a putative tumor suppressor and a potential treatment marker for clear cell RCC.

Keywords clear cell renal cell carcinoma; tumor marker; proteomics; two-dimensional difference gel electrophoresis

肾细胞癌(renal cell carcinoma, RCC)是最为常见的肾恶性肿瘤, 发病率约3%^[1]。RCC是一种高度异质性恶性肿瘤, 起源于肾实质泌尿小管上皮系统, 根据基因和形态学分为不同的亚型, 包括透明细胞癌(75%)、肾乳头状腺癌(10%)、嫌色细胞癌(5%)和未分类RCC^[2]。

目前, 对于局限性肾癌最有效的策略仍是行根治性肾切除手术。然而, 术后复发的风险较高, 30%的患者会发生术后转移^[3], 且对放疗和化疗有较高抵抗性的患者使得治疗手段更加有限。因而, 亟待找到一些特异性标志物来对RCC患者进行早期的诊断、治疗或预后的检测, 提高患者的生存率。近年来, 伴随着对RCC发生机制认识的不断加深, 相关分子标志物不断被报道, 比如细胞角蛋白(cytokeratins)和CD10^[4]、胸腺嘧啶磷酸酶(thymidine phosphorylase)^[5]、碳酸酐酶(carbonic anhydrase)^[6]、烯醇酶(enolase)和血小板反应蛋白(thrombospondin)^[7]、PAX2/PAX8^[8]、上皮细胞钙黏蛋白(E-cadherin)^[9]和肾特异性钙黏蛋白(kidney-specific cadherin)^[10]等, 但仍然缺乏有效的肾癌诊断、治疗和预后的分子标志物。蛋白质组学技术是一种有效的发现生物标志物的方法, 比如荧光差异凝胶电泳(difference gel electrophoresis, DIGE)是一种用于体液或组织蛋白分离及表达谱分析强有力的工具^[11], 尤其是在比较肿瘤和正常组织中蛋白表达差异方面有着较好的敏感性和稳定性^[12]。

本研究使用蛋白质组学方法筛选肾癌患者组织中异常表达的蛋白, 并对其中差异表达显著的蛋白进行验证, 以期找到与肿瘤治疗密切相

关的标志物。

1 对象与方法

1.1 对象

100例病例资料, 共132对肾透明细胞癌及正常对照组织均来自于北京协和医院泌尿外科2012年3月至2013年5月的手术患者, 组织标本的采集和使用均获得患者的知情同意和医院伦理委员会的批准。患者进行肾切除术后, 立即将癌和对照组织进行分离, 并用PBS缓冲液冲洗以去除细胞碎片及残留的血液。获取的新鲜组织后, 一半迅速冻存于液氮, 用于蛋白和RNA提取; 一半浸泡于甲醛固定液后送做病理诊断, 石蜡包埋组织连续切片用于免疫组织化学染色。其中16对新鲜组织标本用于蛋白质组学研究(16例), 100对石蜡包埋组织样本(84例)用于免疫组织化学验证, 16对新鲜组织用于Western印迹和qRT-PCR分析。

用于DIGE分析的16例肾透明细胞癌患者年龄31~76(中位52.4)岁, 男女比例11:5, 均为T1~T3期患者(表1)。

1.2 方法

1.2.1 蛋白提取和标记

肾癌及对照组织用液氮研磨后, 加入含有蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液(7 mol/L尿素, 2 mol/L硫脲, 4% CHAPS, 30 mmol/L Tris Base), 置于冰上充分裂解后进行超声, 而后4 °C, 13 000 r/min离心30 min, 留取上清用2-D Quant试剂盒(德国GE Healthcare公司)进行蛋白定量。

表1 用于DIGE分析的16例肾透明细胞癌患者的临床特征

Table 1 Clinical characteristics of 16 renal cell carcinoma patients by DIGE analysis

编号	性别	年龄/岁	T	N	M	病理诊断	肿瘤大小/cm
1	男	42	T ₂	N ₀	M ₀	Clear cell	8.6 × 6.7 × 5.6
2	男	41	T _{1b}	N ₀	M ₀	Clear cell	7.6 × 6 × 6.1
3	男	56	T _{1a}	N _x	M _x	Clear cell	3.2 × 2.5 × 2.0
4	女	52	T _{1a}	N ₀	M ₀	Clear cell	3.3 × 3 × 3.0
5	男	55	T _{1b}	N _x	M ₀	Clear cell	4.7 × 3.4
6	女	31	T ₂	N ₀	M ₀	Clear cell	6.7 × 5.6
7	男	56	T _{1b}	N ₀	M ₀	Clear cell	3.7 × 2.8 × 4.2
8	男	52	T _{1b}	N ₀	M ₀	Clear cell	5.8 × 5.5 × 3
9	男	44	T _{1a}	N _x	M ₀	Clear cell	2.1 × 1.9 × 3
10	女	48	T _{1b}	N ₀	M ₀	Clear cell	4 × 3 × 2
11	女	76	T _{1a}	N ₀	M ₀	Clear cell	2.9 × 2.3
12	女	53	T _{1a}	N ₀	M ₀	Clear cell	—
13	男	68	T _{1a}	N ₀	M ₀	Clear cell	2.8 × 2 × 3
14	男	53	T _{1b}	N ₀	M ₀	Clear cell	6.8 × 6.5 × 6.0
15	男	58	T _{3b}	N ₀	M ₀	Clear cell	2.5 × 3.0
16	女	54	T _{3a}	N _x	M ₀	Clear cell	4.8 × 6.2

取蛋白裂解液用CyDyes染料(德国GE Healthcare公司)标记。为降低染料的非特异性标记,将肿瘤和正常组织分别用Cy3和Cy5标记,同时吸取每个样本25 μg混合后作为内参并用Cy2标记,50 μg蛋白样本分别用400 pmol染料在冰上避光标记30 min后,加入10 mmol/L L-lysine进行终止。标记后肿瘤、正常及内参样本各50 μg,混合和用于等电聚焦。

1.2.2 二维聚丙烯酰胺凝胶电泳(2D-DIGE)

将染料标记后的样本150 μg与水化液(7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 2% CHAPS, 100 mmol/L 二硫苏糖醇和0.5% IPG-buffer pH 3~10 NL)混合后,与IPG胶条(pH 3~10 NL, 24 cm, 德国GE Healthcare公司)室温下避光孵育进行过夜水化,然后在Ettan IPGphor II(GE Healthcare)上等电聚焦85 000 Vhr。然后将胶条分别在含有1% w/v DTT和2.5% w/v碘乙酰胺的平衡液中孵育15 min(6 mol/L 尿素, 30% v/v glycerol, 2% w/v SDS和50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.8),进行还原和烷基化处理,平衡后的胶条转移至SDS-PAGE胶上层,以1 mA/gel的恒流在15 °C环境下进行避光电泳,直至溴酚蓝条

带到达胶的底部。

1.2.3 图像扫描和分析

电泳完成后的DIGE分析胶用Typhoon多功能扫描成像系统(GE Healthcare)分别对Cy2, Cy3, Cy5荧光染料标记的图像进行扫描,激发光和发射光栅分别为488/520 nm(Cy2), 532/580 nm(Cy3)和633/680 nm(Cy5),扫描精度为100 μm。制备胶在经过扫描后用考马斯亮蓝G250过夜染色,用于分析后的切胶和打点。

用DeCyder™图像分析软件对DIGE图像进行分析,先进行各凝胶上蛋白点的检测和配对,以内参为对照进行均一化处理,通过单因素方差分析选取组间表达差异>1.5倍的点($P < 0.05$),在制备胶上进行切胶。

1.2.4 DI-ESI(±)-FTICR 质谱鉴定和分析

切下的凝胶按照程序依次进行脱色和酶解处理,首先在25 mmol/L NH₄HCO₃/50%乙腈混合液中平衡2次,每次30 min,然后100%乙腈脱水10 min,脱水后的胶块在56 °C下还原处理1 h(10 mmol/L DTT/20 mmol/L NH₄HCO₃),室温下碘乙酰胺化(25 mmol/L碘乙酰胺/20 mmol/L

NH₄HCO₃)避光处理1 h, 100%乙腈再次脱水后, 加入10 μL 12.5 ng/μL胰酶(Promega), 在4 °C在下孵育1 h后放入37 °C进行过夜消化后, 用于质谱分析。

所有的质谱分析在离子电喷雾-三重四级杆-傅立叶变换离子回旋共振质谱中进行检测(9.4 Tesla, 美国Bruker Daltonics公司), 正离子模式参数设置如下: 毛细管电压, 3 900 V; 喷雾保护电压, 3 300 V; 电喷雾流量, 1.0 L/min, 干燥气体流量, 5.0 L/min; 干燥气体温度, 180 °C。以血管紧张素III(美国Sigma公司)和hACTH(18-39)(美国Sigma公司)为外部标准品, 将酶切后的肽段与其混合后, 以3 μL/min的速度入用注射器泵直接注入离子源, 采集质核比(m/z)800~4 000 Da的信号, 每张谱图通过5次扫描积累获得, 最小信噪比为10, 每200 Da的峰密度为50, 且每个蛋白点最多有200个峰, 误差率<2 ppm。鉴定后的序列在NCBI nr MASCOT (www.matrixscience.com)数据库中使用搜索算法进行比对和鉴定, 然后比对分子质量、等电点、覆盖序列比例(Sequence coverage)、得分、比对肽段数、误差率和P值等筛选确定目标蛋白。

1.2.5 提取总 RNA 和反转录

利用试剂盒方法(RNeasy Mini Kit, 德国Qiagen公司), 从30 mg冻存组织中提取总RNA, 提取出来的核酸通过进行2%凝胶来评估, 并用Nanodrop One(美国Thermo Scientific公司)测定RNA浓度和纯度。以Random primer(美国Promega公司)为引物, 在M-MLV反转录酶的作用下, 将1 μg总RNA反转录成cDNA。具体步骤为: 先将RNA与随机引物, 70 °C/10 min后, 迅速置于冰上冷却; 然后加入Buffer/RNase inhibitor/10 mmol/L

dNTP/M-MLV, 37 °C/60 min, 75 °C/15 min, 4 °C/8 min。与此同时, 为防止RNA样品中混有基因组DNA的污染, 应设置不含有反转录酶的阴性对照组同时进行。

1.2.6 实时荧光定量 PCR

实时荧光定量PCR(real-time quantitative PCR, qRT-PCR)反应采用ABI 7500 Fast Dx Real-Time PCR System。引物序列见表2。

PCR反应体系为10 μL, 包括: 5 μL Fast SYBRTM Green Master Mix, 2 μL cDNA和2 μL引物。反应条件如下: 95 °C (10 s), 1个循环; 95 °C (3 s); 60 °C (34 s), 40个循环。每个样品都有3个复孔, GAPDH作为内参基因, 同时设置一个阴性对照。基因相对表达量的分析采用2^{-ΔΔCt}法来计算。

1.2.7 Western 印迹法

将组织切成<0.5 cm³的方块, 加入含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液, 冰上反复匀浆后, 在低温水浴中进行非接触超声裂解(DiagenodeTM BioruptorTM Pico Ultrasonicator), 然后置于冰上裂解10 min, 12 000 r/min离心10 min。蛋白定量后, 取40 μg进行SDS-PAGE和转膜(iBlot2, 美国Thermo Scientific公司)。转膜结束后, 用TBST缓冲液冲洗3次, 2% BSA溶液室温封闭1 h。随后, 分别加入一抗4 °C过夜孵育, 其中NNMT和ACY1为鼠单克隆抗体(英国Abcam公司)、膜联蛋白(Annexin IV)为羊单克隆抗体(美国Santa Cruz公司)、Calbindin为兔单克隆抗体(德国CST公司), 然后辣根过氧化物酶标记的二抗(美国Santa Cruz公司)室温孵育1 h, 最后加入ECL显色液后在凝胶成像仪(Kodak Image Station 4000R)上进行拍照。

表2 目的及内参基因的qRT-PCR引物

Table 2 Primers of target and reference gene

基因	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
ACY-1	CATGCCTGCTGCCACTGACAACC	CCACCCCACGGAGGAACACA
NNMT	CAGGAGCTGGAGAAGTGGCT	GGACCCTTGACTCTGTTCCT
Calbindin	ATCCCTCATCACAGCCTCAC	TCCATCATCTCTTTGCCATA
Annexin IV	GGAGGTACTGTCAAAGCTGC	GCCACTCAGTTCTGACTTCAG
GAPDH	CTCTGCTCCTCCTGTT CGAC	ACGACCAAATCCGTTGACTC

1.2.8 免疫组织化学

将浸泡在10%甲醛固定液中的RCC及对对照组织标本取出,进行石蜡包埋、切片,分别进行HE染色和免疫组织化学。鼠单克隆抗体NNMT和ACY1购自英国Abcam公司,二抗使用DaKo Envision FLEX系统,并在全自动免疫组织化学染色仪上进行(丹麦Dako公司),评分的方案按照强度和比例分别计量后加和,其中强度(-)为0,(+)为1,(++)为2,(+++为3,比例占0%为0,0.1%~5%为1,5.1%~25%为2,25.1%~50%为3,50.1%~75%为4,75.1%~100%为5,数据分析均采用SPSS 19.0软件。

1.3 统计学处理

采用单因素方差分析(AVONA)法对DIGE凝胶结果中的蛋白差异表达进行分析;对实时荧光定量PCR、免疫组织化学评分、Western印迹灰度值的显著性分析采用Student' *t*-test;临床资料的描述采用百分比,组间比较采用 χ^2 检验。所有实验数据的统计分析均采用SPSS 19.0进行分析,双侧检验,并以 $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 肾透明细胞癌和癌旁组织的蛋白质组学分析

利用2D-DIGE分析16例肾透明细胞癌患者肿

瘤和对照组织的蛋白质组学(图1),临床资料见表1,在pH 3.0~10.0和10~170 kD (1 D=1 U)的分子质量范围内,使用DeCyder™统计软件工具对1 873个蛋白质表达进行了检测和分析,通过丰度值的定量和比较,在95%CI筛选出表达丰度 ≥ 1.5 倍的95个蛋白点,从制备胶上切下68个肉眼可见的蛋白点,通过胰蛋白酶消化后进行质谱鉴定。

鉴定后的数据在NCBI数据库中搜索和比对后,结合分子质量和等电点、肽质量指纹图谱中比对肽段数、覆盖序列比例、期望误差和 $P < 0.05$,鉴定出61个目标蛋白(表3),包括53种蛋白,其中结构蛋白7个(13.2%),胞质代谢酶类26个(49%),线粒体代谢相关蛋白11个(20.8%),营养、运输、应激、辅酶等功能蛋白9个(19%),其中18个蛋白在肿瘤中表达上调,35个蛋白表达下调。表达上调的蛋白中包含了离子通道活性(氯离子通道蛋白),转运活性(Vitamin D结合蛋白、铁蛋白),酶调节活性(抗胰酶蛋白、ATP合成酶、NADH脱氢酶),催化活性(碳酸酐酶,尼克酰胺-N-甲基转移酶NNMT,氨基酰化酶ACY1),结构分子活性(微管蛋白,波形蛋白和角蛋白)以及结合和转运(膜联蛋白Annexin IV,钙结合蛋白Calbindin,热休克蛋白)等。此外,在几个蛋白肽段中发现了相同的蛋白质,可能是由于转录后的不同修饰。

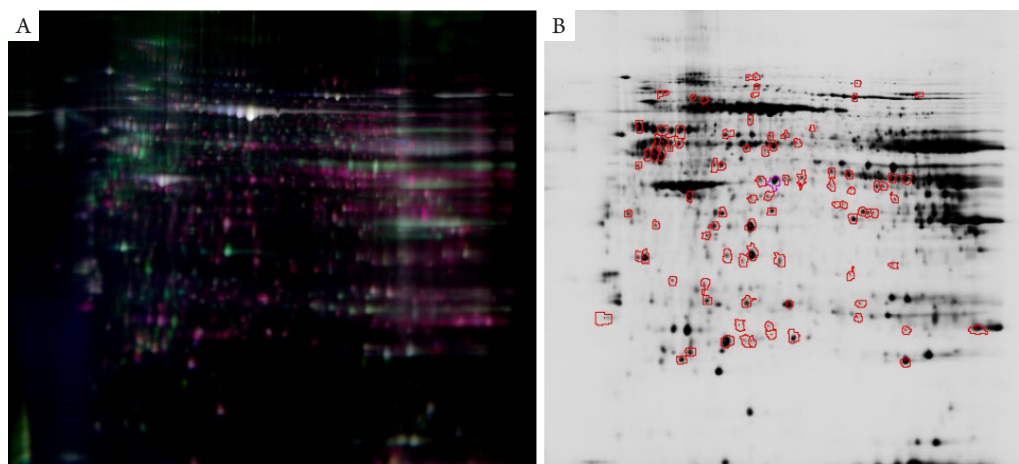


图1 16例肾透明细胞癌肿瘤和癌旁组织2D-DIGE分析

Figure 1 2D-DIGE analysis and preparative gels of early stage of clear cell renal cell carcinoma

(A)肾透明细胞癌和正常肾组织荧光差异凝胶电泳图像, pH 3~10NL胶条, 12.5% SDS-PAGE; (B)用DeCyder™图像分析软件对DIGE图像进行分析,通过单因素方差分析选取肿瘤和癌旁组织表达差异大于1.5倍的95个蛋白($P < 0.05$)。

(A) 2D-DIGE fluorescent photography of clear cell renal cell carcinoma and normal kidney tissues (fused image), pH 3~10, 12.5% SDS-PAGE is presented; (B) Ninety-five differential proteins between carcinoma and normal tissues were significantly labeled with markers, whose average abundances of spots were quantified and those with relative changes in abundance were greater than 1.5 times up or down at 95% confidence level ($P < 0.05$).

表3 蛋白质组学鉴定和分析61个差异 ≥ 1.5 倍的蛋白点

Table 3 Proteomic analysis and identification of 61 sports more than 1.5-fold expression difference

编号	蛋白名称	UniProtKB/ Swiss-Prot	等电点 (PI)	分子 质量 (MW)	覆盖 序列 比例/%	得分	期望 误差	匹配肽 段数	差异 倍数	P
455	凝胶素蛋白	P06396.1	5.9	86 043	11	24	91	10	+1.75	0.0021
499	糖蛋白 α 亚基	P04217.4	5.58	54 809	30	64	0.0075	11	+5.26	0.0030
500	糖蛋白 α 亚基	P04217.4	5.58	54 809	37	85	5.8e-005	13	+4.84	0.026
881	抗胰酶蛋白 α 亚基	P01009.3	5.37	46 878	44	81	0.00015	16	+1.98	0.017
1051	微管蛋白 α 亚基	P68363	4.94	50 804	47	118	3.2e-008	18	+2.04	0.0097
1058	微管蛋白 α 亚基	P68363	4.94	50 804	46	116	5.1e-008	19	+2.19	0.0072
1078	维生素D结 合蛋白	P02774.1	5.4	54 526	37	63	0.0097	12	+1.84	0.0088
1213	波形蛋白	P08670	5.06	53 676	57	125	6.4e-009	34	+5.02	0.0072
1291	波形蛋白	P08670	5.06	53 676	45	80	0.00022	19	+10.02	0.00022
1925	膜联蛋白V	P08758	4.94	35 971	51	104	8.1e-007	18	+2.61	0.00033
1928	膜联蛋白V	P08758	4.94	35 971	54	142	1.3e-010	19	+2.52	0.021
1938	膜联蛋白IV	P09525	5.84	36 088	50	120	2e-008	21	+4.40	8.5e-006
1947	膜联蛋白IV	P09525	5.84	36 088	50	133	1e-009	21	+6.83	0.00044
2010	氯离子通道 蛋白	O00299	5.09	27 248	38	70	0.0021	8	+2.90	0.0013
2028	蛋白酶体 激活复合 物亚基2	Q9UL46	5.44	27 515	51	68	0.0035	11	+2.01	0.0037
2057	碳酸酐酶1	P00915	6.59	28 909	45	68	0.0036	10	+2.02	0.022
2092	磷酸甘油变 位酶1	P18669	6.67	28 900	59	107	4e-007	19	+1.89	9e-005
2104	尼克酰胺-N- 甲基转移酶	P40261	5.56	30 011	21	36	4.5	4	+5.82	7.2e-005
2106	磷酸甘油变 位酶1	P18669	6.59	28 909	52	102	1.3e-006	16	+1.89	0.0091
2269	铁蛋白重链	P02794	5.3	21 383	54	80	0.00019	9	+2.14	0.0084
2286	α -晶体蛋白 β 链	P02489	6.76	20 146	62	82	0.00012	10	+2.20	0.026
2291	线粒体ATP 合成酶亚基	O75947	5.21	18 537	77	83	0.00011	12	-1.96	2e-005

续表3

编号	蛋白名称	UniProtKB/ Swiss-Prot	等电点 (PI)	分子 质量 (MW)	覆盖 序列 比例/%	得分	期望 误差	匹配肽 段数	差异 倍数	P
571	酰基氨基酸 释放酶	P13798	5.29	82 142	40	82	0.00011	18	-2.22	6.9e-006
626	线粒体 NADH泛醌 氧化还原酶 亚基(75 kD)	P28331	5.89	80 443	41	92	1.3e-005	23	-2.89	4.3e-008
941	线粒体热休 克蛋白 (60 kD)	P10809	5.7	61 187	48	92	1.2e-005	20	-2.53	2e-005
1138	肾小管间质 肾炎抗原	Q9GZM7	6.54	53 721	26	72	0.0012	12	-2.61	9e-005
1151	线粒体醛脱 氢酶	P05091	6.63	56 859	43	110	2e-007	22	-3.49	3.3e-006
1185	线粒体ATP 合成酶β 亚基	P06576	5.26	56 525	53	117	4e-008	22	-2.07	0.00061
1326	线粒体细胞 色素b-c1 复合物亚 单位1	P31930	5.94	53 297	64	112	1.3e-007	28	-2.75	6.9e-006
1384	线粒体甘 氨酸脒基 转移酶	P50440	8.26	48 938	54	121	1.6e-008	23	-17.92	9.1e-008
1429	氨基酰化酶	Q03154	5.77	46 084	57	94	9.1e-006	24	-3.32	1e-006
1457	氨基酰化酶	Q03154	5.77	46 084	61	192	1.3e-015	30	-3.77	1.5e-007
1554	琥珀酸辅 酶A连接酶β 亚基	Q9P2R7	6.15	46 824	30	35	6.7	11	-2.13	0.00073
1587	甜菜碱同 型半胱氨酸 S-甲基转移 酶2	Q9H2M3	5.61	40 841	76	102	1.3e-006	22	-3.30	0.00057
1621	线粒体酰基 辅酶脱氢酶	P45954	6.53	47 797	37	94	7.9e-006	12	-4.30	7.5e-006
1651	乙醇脱氢酶 [NADP+]	P14550	6.32	36 892	54	98	3.5e-006	15	-3.50	5.4e-005

续表3

编号	蛋白名称	UniProtKB/ Swiss-Prot	等电点 (PI)	分子 质量 (MW)	覆盖 序列 比例/%	得分	期望 误差	匹配肽 段数	差异 倍数	P
1175	线粒体ATP 合成酶β 亚基	P06576	5.26	56 525	57	102	1.3e-006	22	-1.70	0.00088
1684	甘油-3-磷 酸脱氢酶 [NAD+]	P21695	5.81	38 171	76	143	1e-010	22	-6.68	2.4e-007
1723	酯水解酶 C11/f54	Q9H0W9	6.23	35 608	39	83	0.00011	17	3.61	2.4e-005
1756	微管蛋白β亚 基2C链	P68371	4.79	50 255	32	90	2.1e-005	19	-2.01	0.0022
1803	L-乳酸脱氢 酶β链	P07195	5.71	36 900	53	77	0.00043	23	-2.90	1.5e-006
1957	天冬氨酸酰 基转移酶2	Q96HD9	5.56	35 504	44	78	0.00034	11	-3.66	4.3e-008
1959	线粒体3-羟 基异丁酸脱 氢酶	P31937	8.38	35 705	33	70	0.0022	12	-2.93	2.4e-005
1995	Phenazine biosynthesis- like domain- containing protein	P30039	6.06	32 050	67	144	8.1e-011	20	-4.27	0.00083
2120	线粒体烯 酰-CoA水 合酶	P30084	8.34	31 823	53	135	6.4e-010	17	-3.87	5e-005
2237	硫氧化还原 蛋白依赖的 过氧化物酶	P30048	7.67	28 017	48	69	0.0028	11	-2.17	0.00023
2245	谷胱甘肽过 氧化物酶3	P22352	8.26	25 765	37	75	0.0007	10	-2.59	0.001
2249	谷胱甘肽过 氧化物酶3	P22352	8.26	25 765	53	62	0.013	16	2.43	0.00038
2171	钙结合蛋白	P05937	4.70	30 291	60	95	6.1e-006	16	-8.96	1.5e-005
1541	甜菜碱同型 半胱氨酸 S-甲基转 移酶1	Q93088	6.58	45 426	50	82	0.00012	19	-1.85	0.0038
1364	精氨基琥珀 酸合成酶	A8KAP9	8.08	46 786	47	73	0.00093	20	-4.67	0.00033

续表3

编号	蛋白名称	UniProtKB/ Swiss-Prot	等电点 (PI)	分子 质量 (MW)	覆盖 序列 比例/%	得分	期望 误差	匹配肽 段数	差异 倍数	P
2194	谷胱甘肽 S-转移酶A2	P09210	8.51	25 648	39	81	0.00015	12	-3.73	0.0026
1425	氨基酰 化酶1	Q03154	5.77	46 084	59	159	2.6e-012	27	-3.20	5e-005
1449	氨基酰 化酶1	Q03154	5.77	46 084	59	172	1.3e-013	27	-3.12	1.8e-006
1382	天冬氨酸转 氨酶	P17174	6.52	46 447	50	126	5.1e-009	17	-3.07	0.0019
2228	NADH 脱 氢酶	P19404	8.22	27 659	50	59	0.027	13	-3.06	1e-006
458	线粒体细胞 色素C复合 物R亚基	P47985	8.55	29 934	18	70	0.0022	9	-2.97	0.00026
1663	II型角蛋白	P05787	5.52	53 671	49	87	4.1e-005	30	-2.66	0.0043
1784	鸟嘌呤核苷 酸结合蛋白 β 亚基	P62873	5.60	38 151	43	61	0.015	14	-1.87	0.00019
2253	线粒体三 羧酸循环 辅酶A	Q6NVY1	8.38	43 797	44	62	0.013	16	0.013	0.013
2296	醛糖还原酶	P15121	6.51	36 230	43	68	0.0034	10	0.0034	0.0034

通过文献分析和通路分析,从鉴定的蛋白中筛选表达差异最为显著的4个蛋白进行进一步验证,其中包括两个在肿瘤中表达升高的NNMT(+5.82)和Annexin IV(+2.61),以及两个表达下降的蛋白ACY1(-3.77)和Calbindin(-8.96)(图2)。

2.2 ACY1, Calbindin, NNMT 和 Annexin IV 在 RNA 及蛋白的表达水平

为了验证上述蛋白质组学的结果,从16对

肾透明细胞癌及正常组织样本中提取RNA进行qRT-PCR,结果显示:与正常组织相比,ACY1, Calbindin的mRNA水平在肿瘤组织中显著降低($P<0.01$),而NNMT, Annexin IV的表达显著升高($P<0.01$,图3)。

同样,Western印迹分析4个基因在透明细胞癌中蛋白的表达情况(图4),表明与正常组织相比,ACY1, Calbindin的蛋白水平在肿瘤组织中显著降低($P<0.01$),且NNMT, Annexin IV的表达显著升高($P<0.01$)。

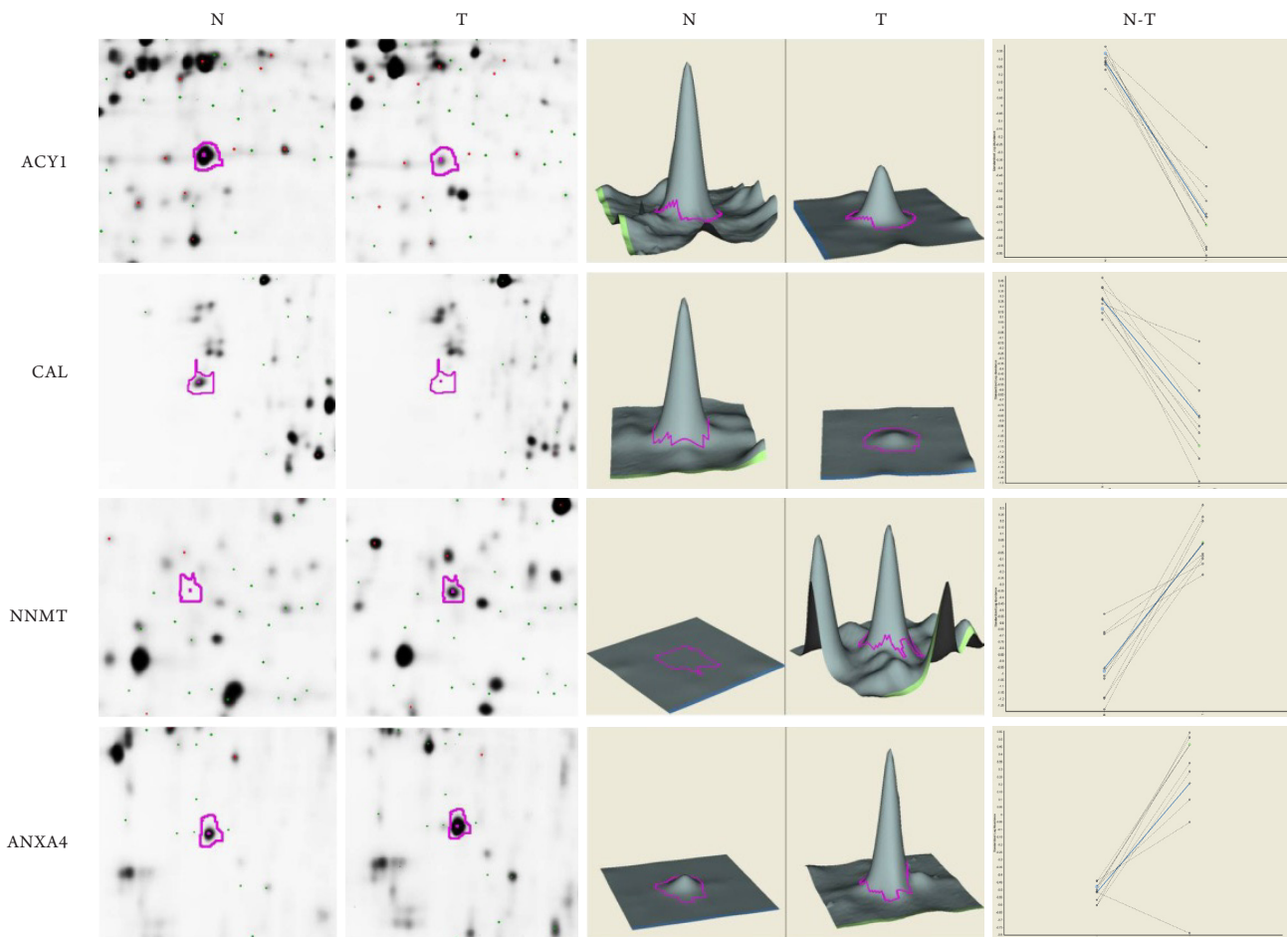


图 2 DeCyder™ 分析肾透明细胞癌中表达差异蛋白 ACY1(-3.77), Calbindin(-8.96), NNMT(+5.82) 和 Annexin IV(+2.61)
Figure 2 Differential analysis of DeCyder™ of expression of four proteins in normal tissues and clear cell renal cell carcinoma tissues

ACY1: 氨基酰化酶1; CAL: 钙结合蛋白; NNMT: 尼克酰胺-N-甲基转移酶; ANXA4: 膜联蛋白IV; N: 正常对照组织; T: 肿瘤组织; N-T: 正常与肿瘤组织之间的分析。

ACY1: Aminoacyase1; CAL: Calbindin; NNMT: nicotinamideN-methyltransferase; ANXA4: Annexin IV; N: normal tissues; T: tumor tissues; N-T: analysis between normal and tumor tissues.

2.3 肾透明细胞癌组织中 ACY1, ANXA4 蛋白的表达情况

将53对肾癌及正常组织均浸泡于10%甲醛固定液中, 进行石蜡包埋, 并用ACY1抗体染色进行免疫组织化学分析。结果显示在正常组织中ACY1蛋白染色在肾小管中呈现阳性并且染色均一, 在高倍镜下可见ACY1在小管上皮细胞的胞浆和胞核中均有较高的表达; ACY1在肿瘤组织中其表达阴

性, 并且组间分析差异有统计学意义($P < 0.001$, 图5)。ACY1蛋白表达水平的下调的程度与患者的年龄、性别、吸烟史、饮酒史、高血压、糖尿病及肿瘤的分级分期之间没有显著的相关性($P > 0.05$, 表4), 提示ACY1蛋白在肾透明细胞癌组织中的表达降低与肿瘤进展和预后生存相关性较小。

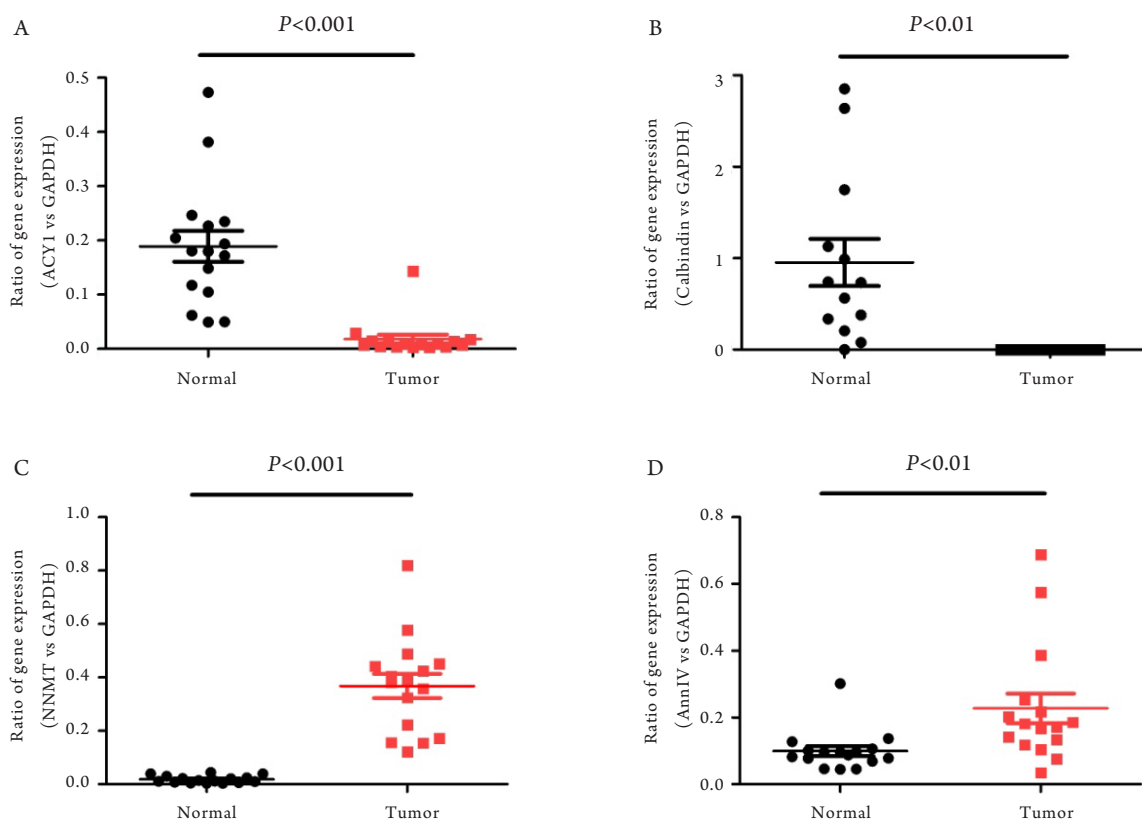


图3 肾透明细胞癌和正常对照组织中ACY1, Cabindin, NNMT和ANXA4 mRNA表达水平

Figure 3 mRNA expression level of ACY1, Cabindin, NNMT and ANXA4 in renal cell carcinoma and normal tissues

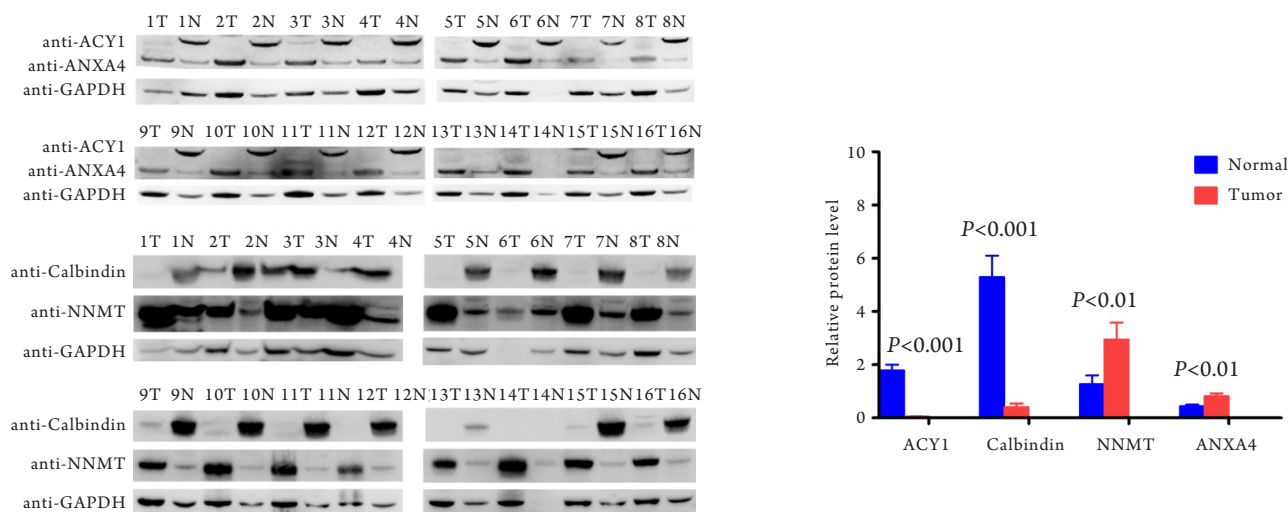


图4 肾透明细胞癌和正常对照组织中ACY1, Cabindin, NNMT和ANXA4 蛋白表达水平

Figure 4 Protein expression level of ACY1, Cabindin, NNMT and ANXA4 in renal cell carcinoma and normal tissues

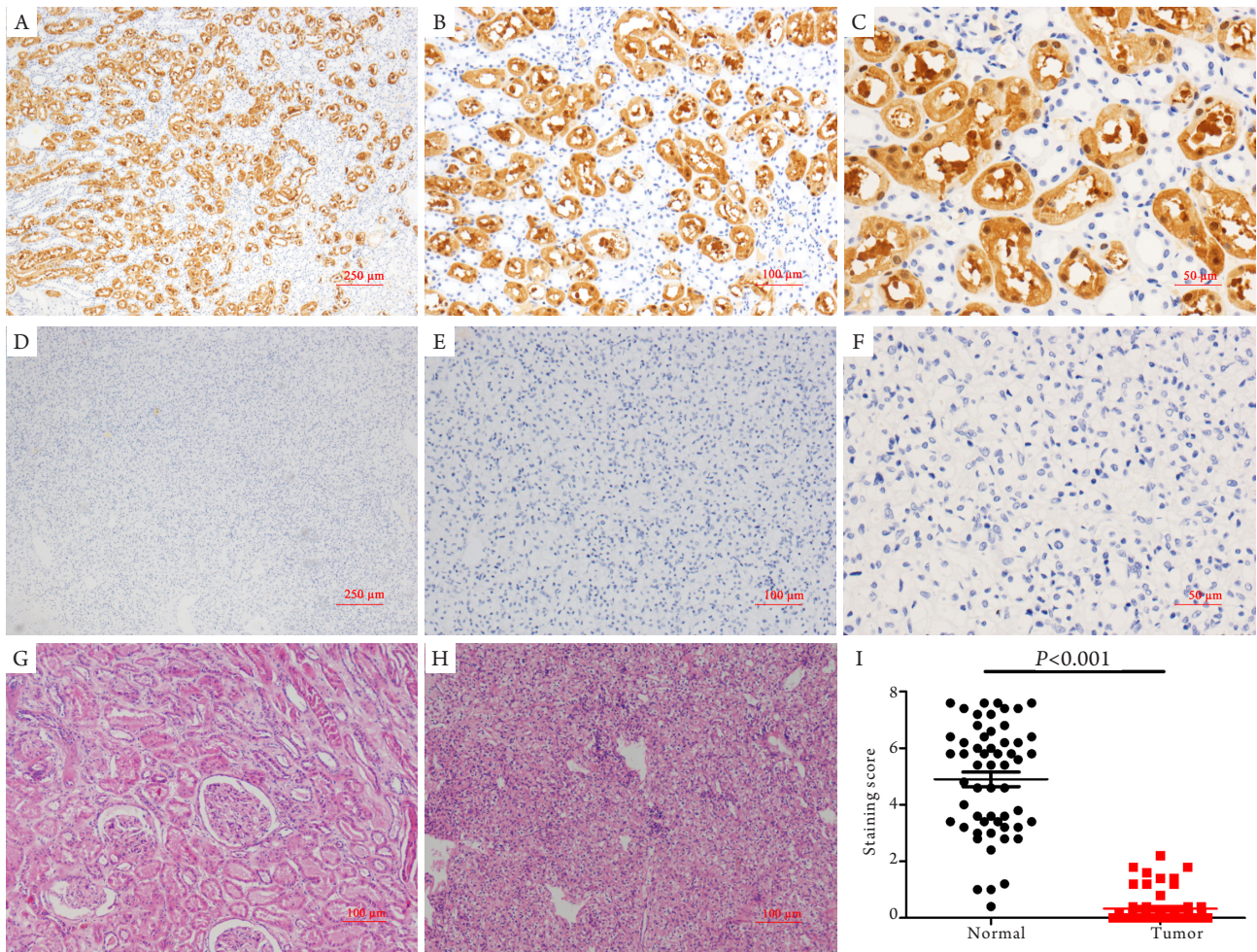


图5 肾透明细胞癌和正常对照组织中ACY1免疫组织化学表达

Figure 5 Immunohistochemical expression of ACY1 in renal cell carcinoma and normal control

(A-C)正常肾组织中ACY1的表达(A: $\times 40$, B: $\times 100$, C: $\times 200$); (D-E)肾透明细胞癌中ACY1的表达(D: $\times 40$, E: $\times 100$, F: $\times 200$); (G)正常肾组织HE染色($\times 100$); (H)肾透明细胞癌HE染色($\times 100$); (I)SPSS对肿瘤和正常对照组织中ACY1表达的统计分析。

(A-C) Expression of ACY1 in normal Renal tissues (A: $\times 40$, B: $\times 100$, C: $\times 200$); (D-E) Expression of ACY1 in ccRCC tissues (D: $\times 40$, E: $\times 100$, F: $\times 200$); (G) Normal renal tissues (HE, $\times 100$); (H) ccRCC tissues (HE, $\times 100$); (I) SPSS of ACY1 expression in 53 pairs of ccRCC and normal tissues.

在肿瘤组织中ANXA4呈现阳性并且染色均一, 高倍镜下显示ANXA4在透明细胞癌的胞浆和胞膜上均有较高的表达, 而胞核中几乎无表达, 而ANXA4在正常组织中表达较低, 分部于少数细胞的胞膜上, 组间分析差异有统计学意义

($P < 0.001$, 图6)。ANXA4的表达上调与肿瘤的临床进展、Fuhrman分级及患者的年龄、性别、吸烟史、饮酒史、高血压、糖尿病等之间没有显著的相关性($P > 0.05$, 表5)。

表4 ACY1蛋白的表达情况与病人的临床病理特征之间的相关性($n=53$)Table 4 Relationship between ACY1 protein expression and clinicopathological features of 53 patients with RCC ($n=53$)

临床参数	病例/[例(%)]	轻度降低/[例(%)]	重度降低/[例(%)]	P
年龄/岁				0.596
≥ 60	20 (37.7)	7 (35.0)	13 (65.0)	
< 60	33 (62.3)	14 (42.4)	19 (57.6)	
性别				0.177
女	17 (32.1)	9 (52.9)	8 (47.1)	
男	36 (67.9)	12 (33.3)	24 (66.7)	
pT分期				0.922
1	40 (75.5)	16 (40.0)	24 (60.0)	
2/3	13 (24.5)	5 (38.5)	8 (61.5)	
pN分期				0.164
0	40 (75.5)	18 (45.0)	22 (55.0)	
1/x	13 (24.5)	3 (23.1)	10 (76.9)	
转移				0.21
M0	35 (66.0)	16 (45.7)	19 (54.3)	
M1/x	18 (34.0)	5 (27.8)	13 (72.2)	
吸烟				0.949
是	23 (43.4)	9 (39.1)	14 (60.9)	
否	30 (56.6)	12 (40.0)	18 (60.0)	
饮酒				0.837
是	16 (30.2)	6 (37.5)	10 (62.5)	
否	37 (69.8)	15 (40.5)	22 (59.5)	
高血压				0.24
是	26 (49.1)	8 (30.8)	18 (69.2)	
否	27 (50.1)	13 (48.1)	14 (51.8)	
糖尿病				0.312
是	10 (18.9)	5 (50.0)	5 (50.0)	
否	43 (81.1)	16 (37.2)	27 (62.8)	

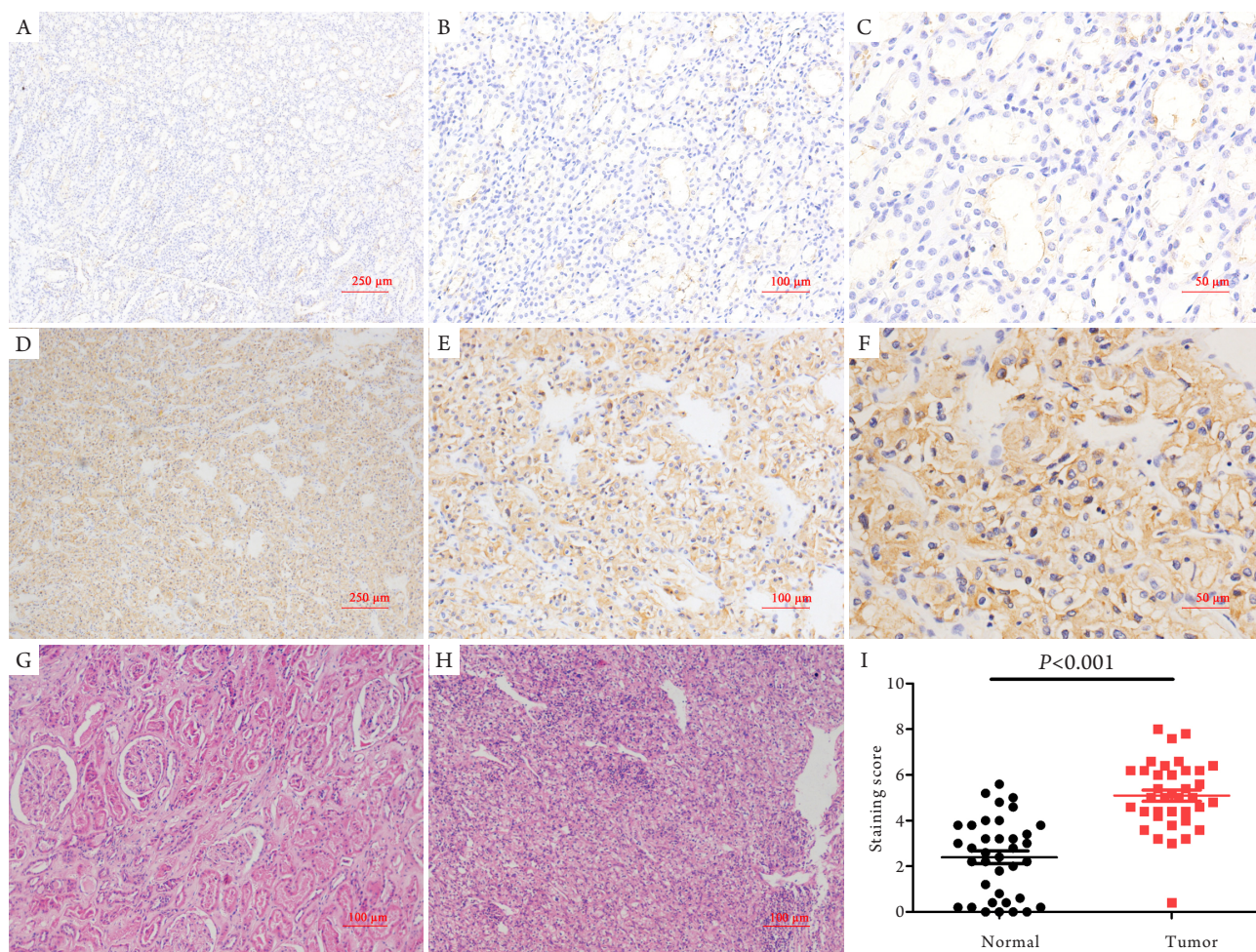


图6 肾透明细胞癌和正常对照组织中ANXA4免疫组织化学表达

Figure 6 Immunohistochemical expression of ANXA4 in renal cell carcinoma and normal times

(A-C)正常肾组织中ANXA4的表达(A: $\times 40$, B: $\times 100$, C: $\times 200$); (D-E)肾透明细胞癌中ANXA4的表达(D: $\times 40$, E: $\times 100$, F: $\times 200$); (G)正常肾组织HE染色($\times 100$); (H)肾透明细胞癌HE染色($\times 100$); (I)47对肿瘤和正常对照组织中ANXA4表达的统计分析。

(A-C) Expression of ANXA4 in normal renal tissues (A: $\times 40$, B: $\times 100$, C: $\times 200$); (D-E) Expression of ANXA4 in ccRCC tissues (D: $\times 40$, E: $\times 100$, F: $\times 200$); (G) Normal renal tissues (HE, $\times 100$); H: ccRCC tissues (HE, $\times 100$); (I) SPSS of ANXA4 expression in 47 pairs of ccRCC and normal tissues.

表5 ANXA4蛋白的表达情况与病人的临床病理特征之间的相关性($n=47$)

Table 5 Relationship between ANXA4 protein expression and clinicopathological features of 47 patients with RCC ($n=47$)

临床参数	病例/[例(%)]	低表达/[例(%)]	高表达/[例(%)]	P
年龄/岁				0.881
≥ 60	18 (38.3)	4 (22.2)	14 (77.8)	
< 60	29 (61.7)	7 (24.1)	22 (75.8)	
性别				0.466
女	13 (27.4)	4 (30.8)	9 (69.2)	
男	34 (72.3)	7 (20.6)	27 (79.4)	

续表5

临床参数	病例/[例(%)]	低表达/[例(%)]	高表达/[例(%)]	P
pT分期				0.517
1	26 (55.3)	7 (26.9)	19 (73.1)	
2	15 (31.9)	3 (20.0)	12 (80.0)	
3	6 (12.8)	1 (16.7)	5 (83.3)	
pN分期				0.264
0	37 (78.7)	10 (27.1)	27 (72.3)	
1/x	10 (21.3)	1 (10.0)	9 (90.0)	
转移				0.427
M0	34 (72.3)	9 (26.5)	25 (73.5)	
M1/x	13 (27.7)	2 (15.4)	11 (84.6)	
Fuhrman分级				0.705
I	17 (36.2)	3 (17.6)	14 (82.4)	
II	22 (46.8)	7 (31.8)	15 (68.2)	
III	8 (17.0)	1 (12.5)	7 (87.5)	
吸烟				0.881
是	18 (38.3)	3 (59.4)	15 (0)	
否	29 (61.7)	8 (27.6)	21(72.4)	
饮酒				0.527
是	12 (25.5)	3 (25.0)	9 (75.0)	
否	35 (74.5)	8 (22.9)	27 (77.1)	
高血压				0.363
是	27 (57.4)	5 (18.5)	22 (81.5)	
否	20 (42.6)	6 (30.0)	14 (70.0)	
糖尿病				0.927
是	9 (19.1)	2 (22.2)	7 (77.8)	
否	38 (80.1)	9 (23.7)	29 (76.3)	

3 讨论

研究RCC的生物标志物对于诊断、预后、药物定位、对治疗反应的监测和个性化的发展非常重要。近年来,蛋白质组分析的研究^[13]表明其是一种识别蛋白表达微小差异、发现可能肿瘤标志物的有效方法。因此,本文通过蛋白质组学分析肾透明细胞癌和正常对照组织,并在DNA/RNA/蛋白和组织层面进行验证,来为RCC找到新的生物标志物。

本研究通过荧光凝胶差异凝胶电泳技术分离出1 873个蛋白点,通过丰度值的定量和比较,在95%CI筛选出表达丰度 ≥ 1.5 倍的95个蛋白点,再通过质谱鉴定61个蛋白,与正常对照组织相比,其中有16个蛋白在肿瘤中表达上调,35个蛋白表达下调。表达上调的蛋白中包含离子通道活性、转运活性、酶调节活性、催化活性、结构分子、结合和转运功能等。已有研究^[14]报道其中部分蛋白与肾癌密切相关,其中波形蛋白用于肾癌的临床诊断和分级分期, Singh等^[2]发现血清铁蛋白的

水平与肿瘤大小和分级分期密切相关, ANXA4、胸腺嘧啶磷酸酶、碳酸酐酶I在肾癌组织和癌旁中有显著表达差异^[15], 但各个分子在透明细胞癌发生发展、预后评估及治疗中的具体机制尚不清楚。

本研究通过蛋白质组学及ANOVA分析表明: 与对照相比, ACY1, NNMT, Cabindin和ANXA4在肾透明细胞癌中表达有显著差异, 其中NNMT与多种肿瘤关系密切, 如在恶性胶质瘤中发现其沉默能够激活肿瘤抑制因子PP2A, 并通过抑制STKs抑制肿瘤的发生^[16]。在结直肠癌中, NNMT通过对ask1-p38 MAPK途径的抑制, 增强了结肠直肠癌细胞对5-氟尿嘧啶的耐药性^[17]。在胃癌中, NNMT表达与原发肿瘤大小、淋巴结转移、远处转移、TNM分级分期和患者预后呈现正相关^[18]。在肾癌中, NNMT与肾癌密切相关^[19-21], 其在透明细胞癌、乳头状癌和嫌色细胞癌中均呈现高表达, 并具有促进肿瘤细胞增殖的能力^[7]。在透明细胞癌的组织渗透液和血清中NNMT均呈现高表达^[20], 本研究也证实了其在透明细胞癌中表达显著升高, 具体可能的通路和机制还需要进一步探讨。

此外, 本研究从RNA和蛋白水平均证实ACY1在肾透明细胞癌中的表达显著降低, 但其降低并没有与肿瘤分级分期呈现显著相关性, 提示其可能是潜在的临床治疗靶点基因。ACY1是在肾、肝、胰腺、脾、胸腺、脑、肺、心脏和骨骼肌中最广泛表达的氨基酰化酶^[22]。有研究^[11]表明: 它不仅仅是作为一种氨基酸酰化酶, 还与肿瘤的发生发展有密切关系。例如与正常对照大鼠相比, ACY1在Fe-NTA诱导的肾癌动物模型中表达显著下调。在神经母细胞瘤中, 其低表达与预后差呈正相关性^[22]。在前列腺癌, 与健康对照和原位癌患者相比, 转移性癌血清中ACY1的含量显著上调, 因此被认为是临床上前列腺癌筛查的候选标志之一^[23]。但是在肝癌的研究却有多种报道, 有研究^[24]显示其在小细胞肝癌中的表达升高, 并被认为在鉴别诊断肝细胞癌和肝退行结节病变中有重要意义, 其敏感性和特异性可达分到96.1%和96.7%。但也有研究^[25]证实ACY1在肝癌中表达显著下降, 并通过与转化生长因子和胞外信号调控激酶通路作用来抑制肿瘤细胞的增殖和侵袭。类似的是, 其在结直肠中也呈现高表达, 且强阳性程度与肿瘤的TNM分期、淋巴结转移、血管浸润以及更短

的临床生存有显著相关^[12]。

本研究通过Oncomine数据库分析ACY1在不同类型的肿瘤与正常组织中的表达情况(<https://www.oncomine.org/>), 其在膀胱癌、食道癌、白血病中表达显著升高, 在淋巴瘤、黑色素瘤和卵巢癌较高, 而在乳腺癌和肾癌中表达下降。对不同肾癌组织的研究^[26]显示ACY1在Wilms肿瘤中表达升高, 而在透明细胞癌中表达下调。这个结果与本研究一致, 但是ACY1在肾透明细胞癌中可能的抑癌作用和通路还需进一步探讨。

ANXA4是膜连蛋白家族成员A亚群中的12个亚类之一, 其可以通过钙离子依赖的方式与磷脂膜结合, 从而参与多种细胞信号转导。近年来的研究显示其表达与肿瘤的发生、发展、转移、治疗及预后都有着密切的关系。Duncan等^[27]的研究显示ANXA4的高表达与结肠癌的预后和淋巴结的转移呈现显著相关性。相反, 在前列腺癌中其表达下调, 且与肿瘤的进展呈正相关^[28]。随着近几年研究发现ANXA4在卵巢透明细胞癌细胞系中呈现高表达, 具有促进细胞的增殖、侵袭和迁移的作用^[29], 并且能够促进细胞内的抗肿瘤药物卡铂外排^[30]。此外, 在化疗药物的作用下ANXA4能够进入细胞核与NF- κ B p50相互作用, 增强肿瘤细胞的抗凋亡能力^[31]。进一步研究^[32]显示在紫杉醇抗性的肺癌细胞H460/T800中其过度表达, 而在293T细胞中过表达ANXA4基因将会增加细胞对紫杉醇治疗的抗性达3倍以上。在肾癌中, Zimmermann等^[33-34]发现ANXA4表达升高, 与本研究相一致, 而本研究显示其升高并没有与肿瘤分级分期有显著相关性, 这有待于进行大样本量研究进一步验证。此外, 该研究^[33]还进一步证实ANXA4能够通过定位细胞内膜来促进乳腺癌肿瘤细胞MCF-7迁徙, 提示其在肿瘤转移和化疗耐药中发挥重要作用。

综上所述, 研究表明ACY1和Annexin IV可作为肾透明细胞癌肿瘤标志物, 可能与肿瘤的靶向治疗及化疗耐药有密切的关系, 其具体的机制和作用有待于深入研究和明确。

参考文献

- 1 Junker H, Venz S, Zimmermann U, et al. Stage-related alterations in renal cell carcinoma--comprehensive quantitative analysis by 2D-DIGE and protein network analysis[J]. PLoS One, 2011, 6(7): e21867.

2. Sinhg KJ, Sinhg SK, Suri A, et al. Serum ferritin in renal cell carcinoma effect of tumor size, volume grade, and stage[J]. *Indian J Cancer*, 2005, 42(4): 197-200.
3. Ho TH, Park IY, Zhao H, et al. High-resolution profiling of histone h3 lysine 36 trimethylation in metastatic renal cell carcinoma[J]. *Oncogene*, 2016, 35(12): 1565-1574.
4. Lin X. Cytomorphology of clear cell papillary renal cell carcinoma. *Cancer*, 2017, 125(1): 48-54.
5. Huang X, Wang L, Chen Y, et al. Poor prognosis associated with high levels of thymidine phosphorylase and thrombocytosis in patients with renal cell carcinoma[J]. *Urol Int*, 2017, 98(2): 162-168.
6. Pickering LM, Larkin J. Kidney cancer: Carbonic anhydrase IX in resected clear cell RCC[J]. *Nat Rev Urol*, 2015, 12(6): 309-310.
7. Teng PN, Hood BL, Sun M, et al. Differential proteomic analysis of renal cell carcinoma tissue interstitial fluid[J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(3): 1333-1342.
8. Waters L, Crumley S, Truong L, et al. PAX2 and PAX8: useful markers for metastatic effusions[J]. *Acta Cytol*, 2014, 58(1): 60-66.
9. Feldkoren B, Hutchinson R, Rapaport Y, et al. Integrin signaling potentiates transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) dependent down-regulation of E-Cadherin expression - Important implications for epithelial to mesenchymal transition (EMT) in renal cell carcinoma[J]. *Exp Cell Res*, 2017, 355(2): 57-66.
10. Williamson SR, Eble JN, Amin MB, et al. Succinate dehydrogenase-deficient renal cell carcinoma: detailed characterization of 11 tumors defining a unique subtype of renal cell carcinoma[J]. *Mod Pathol*, 2015, 28(1): 80-94.
11. Zhong Y, Onuki J, Yamasaki T, et al. Genome-wide analysis identifies a tumor suppressor role for aminoacylase 1 in ironinduced rat renal cell carcinoma[J]. *Carcinogenesis*, 2009, 30(1): 158-164.
12. Shi H, Hayes MT, Kirana C, et al. Overexpression of aminoacylase 1 is associated with colorectal cancer progression[J]. *Hum Pathol*, 2013, 44(6): 1089-1097.
13. Chinello C, L'imperio V, Stella M, et al. The proteomic landscape of renal tumors[J]. *Expert Rev Proteomics*. 2016, 13(12): 1103-1120.
14. Craven RA, Stanley AJ, Hanrahan S, et al. Proteomic analysis of primary cell lines identifies protein changes present in renal cell carcinoma[J]. *Proteomics*, 2006, 6(9): 2853-2864.
15. Unwin RD, Harnden P, Pappin D, et al. Serological and proteomic evaluation of antibody responses in the identification of tumor antigens in renal cell carcinoma[J]. *Proteomics*, 2003, 3(1): 45-55.
16. Palanichamy K, Kanji S, Gordon N, et al. NNMT silencing activates tumor suppressor PP2A, inactivates oncogenic STKs, and inhibits tumor forming ability[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(9): 2325-2334.
17. Xie X, Liu H, Wang Y, et al. Nicotinamide N-methyltransferase enhances resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer cells through inhibition of the ASK1-p38 MAPK pathway[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(29): 45837-45848.
18. Chen C, Wang X, Huang X, et al. Nicotinamide N-methyltransferase: a potential biomarker for worse prognosis in gastric carcinoma[J]. *Am J Cancer Res*, 2016, 6(3): 649-663.
19. Tang SW, Yang TC, Lin WC, et al. Nicotinamide N-methyltransferase induces cellular invasion through activating matrix metalloproteinase-2 expression in clear cell renal cell carcinoma cells[J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(2): 138-145.
20. Kim DS, Choi YP, Kang S, et al. Panel of candidate biomarkers for renal cell carcinoma[J]. *J Proteome Res*, 2010, 9(7): 3710-3719.
21. Su Kim D, Choi YD, Moon M, et al. Composite three-marker assay for early detection of kidney cancer[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2013, 22(3): 390-398.
22. Long PM, Stradecki HM, Minturn JE, et al. Differential aminoacylase expression in neuroblastoma[J]. *Int J Cancer*, 2011, 129(6): 1322-1330.
23. Jansen FH, van Rijswijk A, Teubel W, et al. Profiling of antibody production against xenograft-released proteins by protein microarrays discovers prostate cancer markers[J]. *J Proteome Res*, 2012, 11(2): 728-735.
24. Jin GZ, Li Y, Cong WM, et al. iTRAQ-2DLC-ESI-MS/MS based identification of a new set of immunohistochemical biomarkers for classification of dysplastic nodules and small hepatocellular carcinoma[J]. *J Proteome Res*, 2011, 10(8): 3418-3428.
25. Wei X, Li J, Xie H, et al. Proteomics-based identification of the tumor suppressor role of aminoacylase 1 in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Lett*, 2014, 351(1): 117-125.
26. Cutcliffe C, Kersey D, Huang CC, et al. Clear cell sarcoma of the kidney: up-regulation of neural markers with activation of the sonic hedgehog and Akt pathways[J]. *Clin Cancer Res*. 2005, 11(22): 7986-7994.
27. Duncan R, Carpenter B, Main LC, et al. Characterisation and protein expression profiling of annexins in colorectal cancer[J]. *Br J Cancer*, 2008, 98(2): 426-433.
28. Xin W, Rhodes DR, Ingold C, et al. Dysregulation of the annexin family protein family is associated with prostate cancer progression[J]. *Am J Pathol*, 2003, 162(1): 255-261.
29. Mogami T, Yokota N, Asai-Sato M, et al. Annexin A4 is involved in proliferation, chemo-resistance and migration and invasion in ovarian clear cell adenocarcinoma cells[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e80359.
30. Kim A, Enomoto T, Serada S, et al. Enhanced expression of Annexin A4 in clear cell carcinoma of the ovary and its association with chemoresistance to carboplatin[J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(10): 2316-2322.
31. Jeon YJ, Kim DH, Jung H, et al. Annexin A4 interacts with the NF-kappaB p50 subunit and modulates NF-kappaB transcriptional activity in a Ca²⁺-dependent manner[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67(13): 2271-2281.

32. Han EK, Tahir SK, Cherian SP, et al. Modulation of paclitaxel resistance by annexin IV in human cancer cell lines[J]. Br J Cancer, 2000, 83(1): 83-88.
33. Zimmermann U, Balabanov S, Giebel J, et al. Increased expression and altered location of annexin IV in renal clear cell carcinoma: a possible role in tumour dissemination[J]. Cancer Lett, 2004, 209(1): 111-118.
34. Shi T, Dong F, Liou LS, et al. Differential protein profiling in renal-cell carcinoma[J]. Mol Carcinog, 2004, 40(1): 47-61.

本文引用: 郭丹, 王安琪, 赵晓晓, 刘辉, 孙健. 利用蛋白质组学筛选肾透明细胞癌肿瘤标志物[J]. 临床与病理杂志, 2017, 37(10): 2013-2030. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.10.001

Cite this article as: GUO Dan, WANG Anqi, ZHAO Xiaoxiao, LIU Hui, SUN Jian. Potential tumor markers of renal clear cell carcinoma with proteomic[J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2017, 37(10): 2013-2030. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.10.001