

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00136

RASSF1A 表达或缺失的两类早期肺腺癌组织差显蛋白的筛选与鉴定

刘桂芝¹, 吴逸明^{2*}

1. 郑州大学第一附属医院体检科, 郑州 450052

2. 郑州大学公共卫生学院劳动卫生与毒理学教研室, 郑州 450052

[摘要] **目的:**建立 RASSF1A 表达或表达缺失的两类不同早期肺腺癌组织蛋白质的双向电泳凝胶图谱, 筛选并鉴定存在明显表达差异的蛋白质。 **方法:**采用 Western 印迹技术, 从 RASSF1A 转录缺失和 RASSF1A 转录正常的早期肺腺癌标本中筛选出 RASSF1A 表达和表达沉默的癌组织各 5 例。提取组织可溶性总蛋白, 采用固相 pH 梯度双向凝胶电泳技术分离总蛋白, 建立两类不同早期肺腺癌组织蛋白质的双向电泳凝胶图谱; PDQuest 凝胶图像分析软件比较分析, 筛选出差表达的蛋白质点; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱获得相应蛋白质点的肽质量指纹图谱; 搜索蛋白质数据库鉴定差异表达的蛋白质。 **结果:**建立了重复性较好的 RASSF1A 表达或表达缺失的两类不同早期肺腺癌组织蛋白质双向电泳凝胶图谱; 筛选出存在明显表达差异的蛋白质点 17 个, 挖取其中的 9 个进行质谱分析, 9 个蛋白质点均得到了满意的肽质量指纹图谱; 搜索蛋白质数据库鉴定出 5 种蛋白质, 分别是: 细胞色素 b5(cytochrome b5), 60S 磷酸核糖体蛋白 P2(60S acidic ribosomal protein P2), 碳酸酐酶 1(carbonic anhydrase-1), 5-吡咯啉羧酸还原酶 1(pyrraline-5-carboxylate reductase-1) 和载脂蛋白 A-I 前体蛋白(apolipoprotein A-I precursor)。 **结论:**成功建立了 RASSF1A 表达或表达缺失的两类不同早期肺腺癌组织蛋白质的双向电泳凝胶图谱, 从中鉴定出 5 种存在明显表达差异的蛋白质, 为进一步研究 RASSF1A 作用的信号转导途径奠定了初步的基础。

[关键词] 肺肿瘤; 腺癌; RASSF1 蛋白; 蛋白质组学; 双向凝胶电泳; 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱

[中图分类号] R 734.2 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)02-0136-06

Screen and identification of differential proteins in two early-stage lung adenocarcinoma tissues with and without RASSF1A expression

LIU Gui-zhi¹, WU Yi-ming^{2*}

1. Department of Physical Examination, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

2. Department of Occupational Health and Toxicology, College of Public Health, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052

[ABSTRACT] **Objective:** To establish a two-dimensional electrophoresis (2-DE) gel map of 2 early-stage lung adenocarcinoma tissues with and without RASSF1A expression, so as to screen and identify differential proteins. **Methods:** Five early-stage lung adenocarcinoma tissues with RASSF1A expression and 5 without RASSF1A expression were screened out by Western blotting assay. The total soluble proteins of the tissue were extracted and were separated by immobilized pH gradient based two-dimensional gel electrophoresis to set up the 2-DE gel map of the 2 adenocarcinoma tissues. The differentially-expressed proteins were analyzed by PDQuest image analysis software and identified by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS); the protein database was searched to further characterized the differential proteins. **Results:** A well-reproducible 2-DE gel map of the 2 adenocarcinoma tissues with and without RASSF1A expression was established and 17 differential protein spots were screened out. Nine of 17 differential protein spots were selected for MALDI-TOF-MS study and satisfactory peptide mass fingerprints were obtained for all the 9 spots. Searching of the protein database revealed 5 candidate proteins and they were: cytochrome b5, 60S acidic ribosomal protein P2, carbonic anhydrase 1, pyrroline-5-carboxylate reductase 1, and apolipoprotein A-I precursor. **Conclusion:** We have successfully obtained the 2-DE gel images of 2 early-stage lung adenocarcinoma tissues with and without RASSF1A expression, and from which we have identified 5 differential proteins.

[收稿日期] 2007-10-31 **[接受日期]** 2007-11-20

[基金项目] 国家自然科学基金(30571552). Supported by National Natural Science Foundation of China(30571552).

[作者简介] 刘桂芝, 博士, 主治医师. E-mail: liuguizhi6@yahoo.com.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel:0371-66913091, E-mail: wuym@zzu.edu.cn

which paves a way for studying the signal transduction pathways involving RASSF1A.

[KEY WORDS] lung neoplasms; adenocarcinoma; RASSF1 protein; proteomics; two-dimensional gel electrophoresis; matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(2): 136-141]

肺癌新型候选抑癌基因 Ras 相关结构域家族 1A 基因(Ras association domain family 1A gene, RASSF1A)由 Dammann 等^[1]2000 年报道,是从 3 号染色体短臂 2 区 1 带 3 亚带(3p21.3)克隆得到的。RASSF1A 在肺癌等肿瘤中存在着较高的表达缺失率^[2-3],其失活的主要机制是启动子区 CpG 岛的高甲基化^[4-6]。然而 RASSF1A 的抑癌机制尚不清楚,虽有一些研究报道,但比较零散,RASSF1A 基因的失活究竟导致哪些结构、功能和调节蛋白的变化,RASSF1A 究竟在哪条信号转导通路中发挥抑癌作用仍不得而知。

蛋白质组学(proteomics)是以蛋白质组为研究对象,从整体角度,分析细胞或组织内蛋白质构成的动态变化和活动规律的科学。蛋白质组学研究方法具有从整体水平上高通量发掘与寻求特异性标志物的巨大能力。

本研究拟采用蛋白质组学研究技术,以 RASSF1A 表达或缺失的两类 I 期肺腺癌标本为研究对象,建立两类不同肺腺癌的双向电泳(two-dimensional electrophoresis, 2-DE)凝胶图谱,寻找差异表达蛋白,借助质谱技术和生物信息学手段,鉴定这些差异表达的蛋白质,并通过鉴定蛋白的功能分析,寻找 RASSF1A 蛋白与它们的联系,为进一步研究 RASSF1A 作用的信号转导途径奠定基础。

1 材料和方法

1.1 标本 本组标本来自郑州大学第一附属医院胸外科 2005 年 3 月至 2006 年 5 月间单一行外科手术治疗的 96 例非小细胞肺癌患者。根据实验第一部分 RT-PCR 得出的结果^[3],选取 5 例 RASSF1A 转录缺失和 10 例 RASSF1A 转录正常的 I 期肺腺癌及其相配的癌旁正常肺组织标本共 30 份,癌组织和癌旁正常肺组织标本均经组织病理学检查证实。

1.2 主要试剂 小鼠抗人 RASSF1A 单克隆抗体购自美国 eBioscience 公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体购自美国 KPL 公司;DAB 显色试剂盒购自北京天为时代公司。固相 pH 梯度(immobilized pH gradient, IPG)预制胶条(pH 3~

10, 17 cm), pH 3~10 两性电解质 Bio-Lyte、尿素、硫脲购自美国 Bio-Rad 公司;CHAPS(3-[3-胆酰胺丙基]二乙胺-1-丙磺酸)、Aprotinin(抑肽酶)、PMSF(苯甲磺酰氟)、DTT(二硫苏糖醇)、碘乙酰胺、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、SDS(十二烷基磺酸钠)、TEMED(N'N'N'N'-四甲基乙二胺)均购自 Sigma 公司。

1.3 主要仪器 SDS-PAGE 垂直电泳仪,北京六一仪器厂产品;双向凝胶电泳系统——PROTEIN IEF CELL 等电聚焦仪、PROTEAN II xi cell 电泳仪、GS-800 图像获取仪、PDQuest 7.1 凝胶图像分析软件,均为美国 Bio-Rad 公司产品。

1.4 Western 印迹分析 提取组织可溶性总蛋白,Bradford 法定量^[7]。每例样品取 80 μ g 总蛋白经过 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)后转移至硝酸纤维素膜,用含有 5%奶粉的 TBST 4 $^{\circ}$ C 封闭过夜,用封闭液稀释的小鼠抗人 RASSF1A 单克隆抗体室温孵育 2 h,洗涤后将膜置于封闭液稀释的山羊抗小鼠 IgG 抗体中室温放置 2 h,经 TBS 洗膜后,DAB 试剂盒显色。

1.5 双向电泳 (1)组织总蛋白的制备:根据 Western 印迹结果,筛选出 RASSF1A 表达和表达缺失的 I 期肺腺癌各 5 例。每例取癌组织 80~100 mg,于液氮下充分研磨至粉末状,置于 500 μ l 裂解液(含 7 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,40 mmol/L Tris,4% CHAPS,1% Triton-X100,100 mmol/L DTT,10.2% Bio-Lyte,0.5 mmol/L PMSF,0.5 mmol/L EDTA,1 μ g/ml Aprotinin)中,充分涡旋混匀,置 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h,取出后再充分涡旋,14 600 \times g、4 $^{\circ}$ C 离心 30 min,吸取上清即为组织总蛋白质。Bradford 法^[7]测定样品的蛋白质浓度,-80 $^{\circ}$ C 低温冰箱保存。(2)固相 pH 梯度双向电泳:主要按 IPG-phor 等电聚焦系统指南方法进行。一向等电聚焦电泳程序如下:50 V 主动水化,16 h(17 $^{\circ}$ C);250 V 除盐,30 min;1 000 V 除盐 1 h;升压 5 h 至 10 000 V,聚焦至 80 000 V \cdot h。二向 SDS-PAGE 条件如下:样品浓缩电流每根 17 cm 胶条 5 mA,样品分离电流每根 17 cm 胶条 30 mA。电泳所得的凝胶进行银染

或考马斯亮蓝染色。(3)双向电泳图谱分析:染色后的 SDS-PAGE,用 PDQuest 软件内部支持的图像扫描装置 GS-800 扫描成像,数字化图像用 PDQuest 7.1 软件分析。图像分析过程包括蛋白质点的检测 (detect spots on gels)、蛋白质点的编辑和匹配 (edit spot 和 edit match) 和蛋白质点的相对分子质量 (M_r) 和等电点 (pI) 校正等^[8]。

1.6 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 将扫描分析后的制备型考染凝胶置于明亮的灯光下,用硅烷化的枪头挖取蛋白点,用 2 mg/L 胰蛋白酶胶内酶解蛋白,得到的样品由上海基康生物技术有限公司协助完成 MALDI-TOF-MS 鉴定,获得被检测样品的肽质量指纹图谱。

1.7 数据库检索 根据各肽段的 m/z 数据,用 Mascot (<http://www.matrixscience.com>) 和 ProFound (<http://129.85.19.193/profound-bin/Web-ProFound.exe>) 软件,设置适当的搜索参数,在 NCBIInr, Swiss-prot 蛋白数据库中搜索理论上酶解肽段能与之相匹配的蛋白质,根据搜索结果,结合蛋白质在胶上的等电点和相对分子质量最终确定目的蛋白质。

2 结果

2.1 Western 印迹结果 5 例 RASSF1A 转录缺失的 I 期肺腺癌标本,其表达也缺失,10 例 RASSF1A 转录正常的肺腺癌标本,1 例表达缺失,2 例弱表达,7 例正常表达。而相应的癌旁正常肺组织 RASSF1A 均表达良好。

2.2 RASSF1A 表达或缺失的两类不同早期肺腺癌组织的 2-DE 凝胶图谱 对来自同一标本的总蛋白控制上样量为 0.15 mg,进行 3 次双向电泳,双向凝胶银染,结果显示 3 次银染图谱非常相似。GS-800 获取图像,PDQuest 7.1 软件点检测,获得 RASSF1A 表达或缺失的两类不同早期肺腺癌组织 3 块凝胶的平均蛋白质点数分别为 $1\,715 \pm 63$ 和 $1\,646 \pm 57$ 。通过背景消减,将其中的一块胶定为参考胶,进行 3 块胶间的蛋白质点匹配,RASSF1A 表达或缺失的两类不同早期肺腺癌组织平均匹配的点数分别为 $1\,445 \pm 48$ 和 $1\,382 \pm 36$,匹配率为 85.0%

和 86.3%。获得了重复性较好的 RASSF1A 表达或缺失的两类不同早期肺腺癌组织的双向电泳凝胶银染图谱(图 1)。

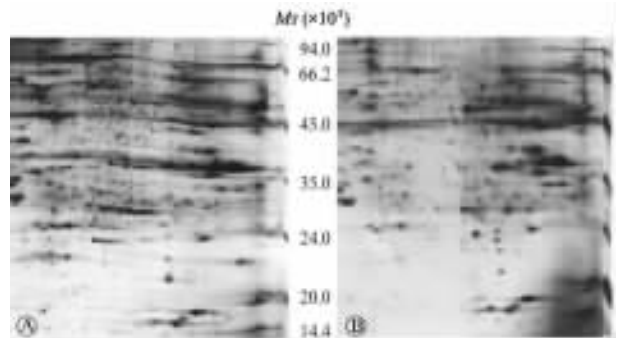


图 1 两类不同早期肺腺癌组织的双向凝胶银染图谱

Fig 1 Two-dimensional gel electrophoresis maps of 2 different kinds of early-stage lung adenocarcinoma tissues (silver staining)

A: Lung adenocarcinoma tissues with RASSF1A expression; B: Lung adenocarcinoma tissues without RASSF1A expression

2.3 RASSF1A 表达或缺失的两类不同早期肺腺癌组织差异显示蛋白质的筛选与鉴定 总蛋白控制上样量为 0.15 mg,分别对 5 例 RASSF1A 表达和 5 例 RASSF1A 表达缺失的早期肺腺癌组织蛋白质进行双向电泳,PDQuest 7.1 软件分析,分别建立 5 块胶的平均凝胶银染图谱。在 RASSF1A 表达的早期肺腺癌组织蛋白质平均凝胶银染图谱上共检测到蛋白质点 1 812 个,在 RASSF1A 蛋白缺失的肺腺癌组织蛋白质平均凝胶图上检测到蛋白质点 1 723 个。将建立的平均凝胶进行匹配,经过反复比对,筛选出在 RASSF1A 表达或缺失的两类不同早期肺腺癌组织中存在明显表达差异的蛋白质点 17 个(认为表达量相差 5 倍以上且至少在 3 块凝胶上均有相同变化的点为差异表达蛋白质点)。

按上述方法,总蛋白控制上样量为 1.5 mg,制备双向电泳考染凝胶,从考染胶上找到与银染胶相对应的差异表达的蛋白质点,首批挖取实验相对分子质量小于 40 000 的 9 个蛋白点进行质谱鉴定(图 2)。9 个蛋白质点均获得了满意的酶解片段肽质量指纹图谱(图 3)。搜索蛋白质数据库,结合候选蛋白的等电点、相对分子质量与实验中测定的等电点、相对分子质量是否一致等信息,最终鉴定出候选蛋白质 5 种(表 1)。

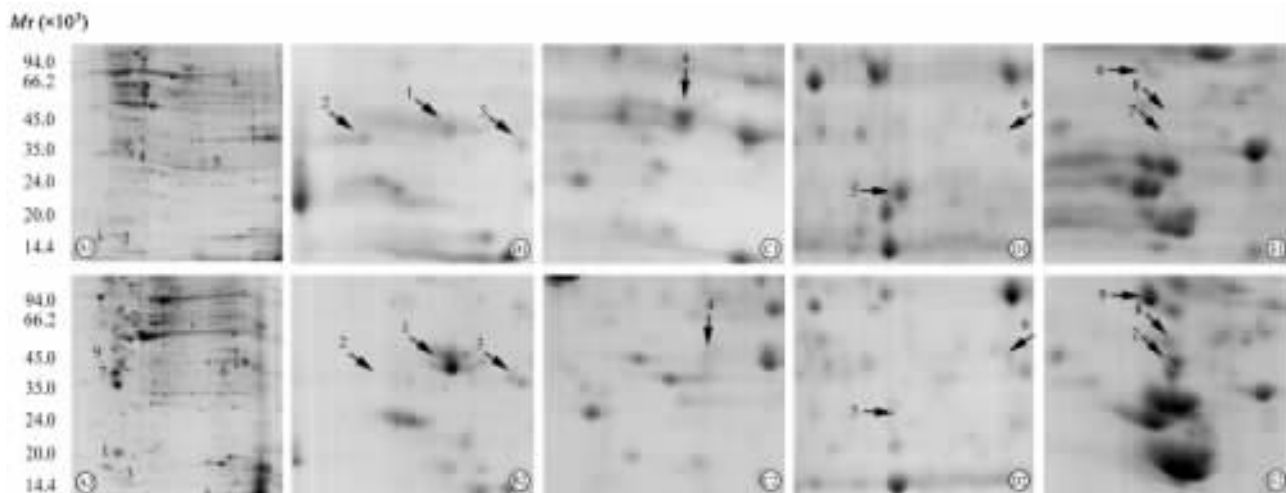


图 2 两类不同早期肺腺癌组织双向凝胶考染图像

Fig 2 Two dimensional gel maps of 2 different kinds of lung adenocarcinoma tissues by Commassie blue staining

A1: Two-dimensional gel electrophoresis map of lung adenocarcinoma tissues with RASSF1A expression ; A2: Two-dimensional gel electrophoresis map of lung adenocarcinoma tissues without RASSF1A expression; B1-E1: Enlargement maps of differential protein spots of lung adenocarcinoma tissues with RASSF1A expression; B2-E2: Enlargement maps of differential protein spots of lung adenocarcinoma tissues without RASSF1A expression. 1-9: Differential protein spots

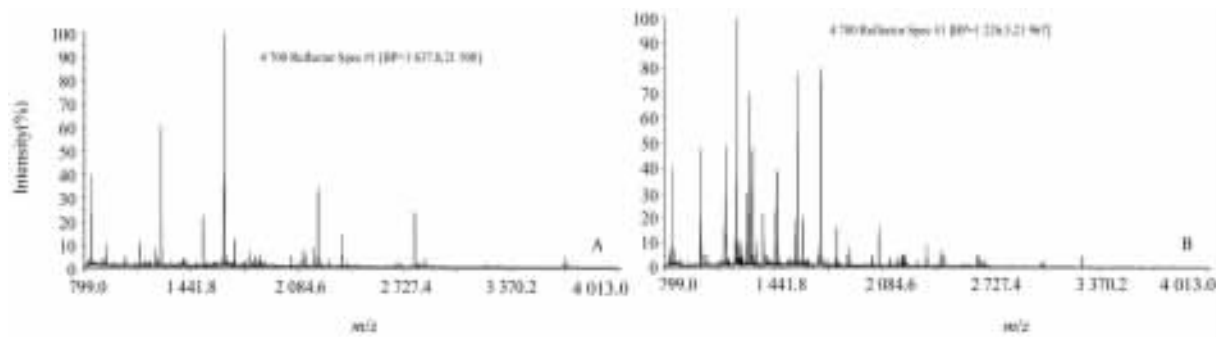


图 3 1 号(A)、5 号(B)蛋白质肽质量指纹图谱

Fig 3 Peptide mass fingerprint of No. 1(A) and No. 5 (B) protein spots

表 1 5 个差异表达蛋白质点肽质量指纹图谱搜索 Swiss-Prot 数据库结果

Tab 1 Search results of peptide mass fingerprints for 5 differential protein spots in Swiss-Prot database

Spot	Accession No.	Matched number	Score	Mr/pI	Sequence overcast(%)	Protein name
1	gi 117809	13/80	133	15 321/4. 88	67	Cytochrome b5
2	gi 133061	MS/MS	142	11 658/4. 42	30	60S acidic ribosomal protein P2
4	gi 113992	30/80	273	30 759/5. 56	78	Apolipoprotein A- I precursor
5	gi 115449	25/80	234	28 852/6. 59	73	Carbonic anhydrase-1
6	gi 60416434	18/80	108	33 340/7. 18	51	Pyrraline-5-carboxylate reductase-1

3 讨论

RASSF1A 位于肺癌发生早期就经常缺失的 3p21. 3, 是一个重要的肺癌候选抑癌基因。自 2000 年发现至今, 研究者们围绕该基因做了大量的研究工作, 许多热点问题, 如 RASSF1A 的结构、分布、失

活机制已逐步得到解决, 也逐步确立了 RASSF1A 作为抑癌基因的地位。对该基因的抑癌机制也进行了一些有益的探索, 虽有所发现, 但缺乏系统性, 仍不清楚 RASSF1A 发挥抑癌作用的信号转导通路。如能较全面把握 RASSF1A 失活后引起的结构、功能和调节蛋白的变化, 再通过蛋白质之间的关系分

析,借助于适当的分子生物学手段,或许能够逐步探知 RASSF1A 发挥抑癌作用的靶点。

本研究借助 Western 印迹法,筛选出 RASSF1A 表达和 RASSF1A 表达缺失的早期肺腺癌标本各 5 例,应用蛋白质组学技术,成功建立了两类不同早期肺腺癌的蛋白质双向凝胶电泳图谱,并从中筛选出存在明显表达差异的蛋白质点 17 个,首批选取实验相对分子质量小于 40 000 的 9 个蛋白质点进行质谱分析,搜索蛋白质数据库,共鉴定出 5 种蛋白质,分别是:细胞色素 b5 (cytochrome b5), 60S 磷酸核糖体蛋白 P2 (60S acidic ribosomal protein P2), 碳酸酐酶 1 (carbonic anhydrase-1), 5-吡咯啉羧酸还原酶 1 (pyrroline-5-carboxylate reductase-1) 和载脂蛋白 A-I 前体蛋白 (apolipoprotein A-I precursor)。

在本研究中,首先制备分析型银染凝胶,主要目的在于利用银染高度灵敏的特性,在凝胶上尽量多地显示出蛋白质点,有利于差显蛋白分析。在分析型银染凝胶上确定差异显示蛋白质点后,接下来制备考染凝胶,并在制备型考染凝胶上获取与银染胶上对应的蛋白质点胶块进行质谱鉴定。因为银染胶中的 Ag^+ 是强氧化剂,可引起蛋白质的化学修饰,在质谱鉴定时影响肽段的相对分子质量,从而造成 m/z 结果的改变,导致肽质量指纹图谱出现误差。选取 9 个蛋白质进行质谱分析,但最终只得到 5 种与实验相对分子质量和等电点相一致的蛋白质。另外 4 种蛋白尽管得到了很好的肽质量指纹图谱,但并没有在蛋白质数据库中找到与之相对分子质量和等电点相匹配的蛋白质,可能的原因有:同一种蛋白可能存在多个剪切本、包含不同的亚基、经受不同的化学修饰如磷酸化、乙酰化等;同时也说明现阶段的蛋白质数据库并不完善,需要进一步的充实。这部分蛋白质尚待通过串联质谱或者氨基酸序列分析的方法再做进一步的鉴定。

在鉴定的 5 种蛋白质中,细胞色素 b5 是细胞内质网上的一种膜结合血红素蛋白,是细胞色素 P450 酶系中的一个重要成员。在生物体内,主要参与细胞色素 P450 的电子转移,参与药物和毒物的氧化过程。细胞色素 b5 在某些肿瘤组织中表达异常。Kumaraguruparan 等^[9]报道,在哺乳动物乳腺癌组织中,细胞色素 b5 表达水平明显增高,而相应的还原酶系如 γ -谷光甘肽转移酶活性降低。Selvendiran

等^[10]检测了瑞士白化病小鼠的肺癌组织,发现在肺癌组织中,细胞色素 b5 表达也明显上调,且存在还原酶系的活性降低。Neubauer 等^[11]运用激光俘获电子微切割技术分别采集仅雌激素受体阳性和雌孕激素受体双阳性的两类不同乳腺癌组织标本,用比较蛋白质组学的方法筛查出的差显蛋白中,细胞色素 b5 在雌孕激素受体双阳性的乳癌组织中较仅雌激素受体阳性的乳癌组织表达水平明显降低。提示雌孕激素受体双阳的乳癌患者,细胞色素 b5 依赖的代谢低调,三苯氧胺代谢减慢,在体内发挥作用持久。在本研究中,RASSF1A 蛋白缺失的肺腺癌标本较 RASSF1A 表达的肺腺癌标本细胞色素 b5 表达明显增高,这可能提示 RASSF1A 蛋白缺失后,肿瘤细胞氧化代谢更活跃,RASSF1A 与代谢酶之间存在着负性调节关系。进行这方面的研究,必将增进对 RASSF1A 抑癌功能的理解。

60S 核糖体蛋白 P2 是一种酸性核糖体蛋白,酸性核糖体蛋白是一组多功能蛋白,由 P0、P1 和 P2 组成。一分子 P0 与两分子异二聚体 P1/P2 组成核糖体大亚基共有的柄,位于核糖体结构活性中心,在蛋白质合成中与 mRNA、tRNA 及转录因子相互作用,参与翻译过程中的调节机制。除此之外,酸性核糖体蛋白还有诸多核糖体外功能,如参与 DNA 修复,调节基因表达,参与物质代谢,且在肿瘤的发生、发展中起一定作用^[12]。P0、P1、P2 各成分的浓度对最终合成的蛋白质产物起关键作用,对某些代谢通路可产生非常重要的影响^[13]。本研究中,RASSF1A 表达缺失的肺腺癌组织中 P2 缺失,这必将导致核糖体中 P0、P1、P2 各成分的浓度比例失调,进而影响某些蛋白质的合成,使正常组织功能失调,这是否为 RASSF1A 发挥抑癌作用的一个方面,有待进一步研究。

碳酸酐酶(carbonic anhydrase,CA)是一种含锌的金属酶。CA 催化的底物 CO_2 及 HCO_3^- 和 H^+ 与人体多种生理和病理活动关系密切,如呼吸过程中代谢组织与肺之间 $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ 转运,pH 与 CO_2 浓度之间的平衡,组织器官中电解质的分泌,青光眼、骨质疏松症、癫痫、肿瘤等疾病的形成等^[14]。近年来,随着 CA 同工酶的不断发现,人们发现 CA 与癌症之间可能存在联系,如 CA9 主要存在于癌细胞中,而在正常细胞中却未见表达^[15]。但尚未见 CA1 与肿瘤关系的报道。在本研究中,CA1 在

RASSF1A 蛋白缺失的肺腺癌标本中表达明显减弱。二者的关系尚有待进一步探讨。

5-吡咯啉羧酸还原酶是一种管家酶,该酶以还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)为辅酶,催化 Δ^1 -吡咯啉-5-羧化物[Delta(1)-pyrroline-5-carboxylate,P5C]还原成为脯氨酸。从 P5C 到脯氨酸的这一酶促反应非常重要,它直接关系到氨基酸的代谢、细胞内的氧化还原反应和细胞凋亡等重要生命过程^[16]。有关 5-吡咯啉羧酸还原酶的研究报道甚少,只知道它在某些肿瘤中活性增高,且会特异性地出现在荷淋巴瘤大鼠的血浆中^[17]。本实验发现,5-吡咯啉羧酸还原酶 1 只在 RASSF1A 蛋白缺失的肺腺癌组织中表达,该蛋白与 RASSF1A 的关系值得进一步研究。

载脂蛋白 A-I 是高密度脂蛋白中主要的蛋白成分。载脂蛋白 A-I 前体向成熟的载脂蛋白 A-I 的转化过程是在细胞外进行的,催化该反应的酶存在于血浆中。但有研究表明,体外培养的肝癌细胞系 HepG2,既能分泌载脂蛋白 A-I 前体,同时又能分泌把载脂蛋白 A-I 前体转化为载脂蛋白 A-I 的转化酶,直接把该前体转化为成熟的载脂蛋白 A-I^[18]。本实验发现它在 RASSF1A 蛋白缺失的肺腺癌组织中表达沉默,是否 RASSF1A 蛋白抑制载脂蛋白 A-I 前体向成熟载脂蛋白 A-I 的转化,有待下一步研究证实。

[参考文献]

- [1] Dammann R, Li C, Yoon J H, Chin P L, Bates S, Pfeifer G P. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21. 3[J]. *Nat Genet*, 2000, 25: 315-319.
- [2] Dammann R, Schagdarsurengin U, Seidel C, Strunnikova M, Rastetter M, Baier K, et al. The tumor suppressor RASSF1A in human carcinogenesis: an update[J]. *Histol Histopathol*, 2005, 20: 645-663.
- [3] 刘桂芝,杨继要,吴逸明. RASSF1A 和 p16 转录本在非小细胞肺癌组织中的表达及相关性研究[J]. *山东医药*, 2006, 46: 14-16.
- [4] Topaloglu O, Hoque M O, Tokumar Y, Lee J, Ratovitski E, Sidransky D, et al. Detection of promoter hypermethylation of multiple genes in the tumor and bronchoalveolar lavage of patients with lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10: 2284-2288.
- [5] Dammann R, Strunnikova M, Schagdarsurengin U, Rastetter M, Papritz M, Hattenhorst U E, et al. CpG island methylation and expression of tumour-associated genes in lung carcinoma [J]. *Eur J Cancer*, 2005, 41: 1223-1236.
- [6] Grote H J, Schmiemann V, Geddert H, Bocking A, Kappes R, Gabbert H E, et al. Methylation of RAS association domain family protein 1A as a biomarker of lung cancer[J]. *Cancer*, 2006, 108: 129-134.
- [7] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [8] 张慧珍,范清堂,吴逸明. 肺癌组织中蛋白质组双向电泳图谱分析方法的建立[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2005, 40: 416-418.
- [9] Kumaraguruparan R, Subapriya R, Balachandran C, Manohar B M, Thangadurai A, Nagini S. Xenobiotic-metabolizing enzymes in canine mammary tumours[J]. *Vet J*, 2006, 172: 364-368.
- [10] Selvendiran K, Thirunavukkarasu C, Singh J P, Padmavathi R, Sakthisekaran D. Chemopreventive effect of piperine on mitochondrial TCA cycle and phase-I and glutathione-metabolizing enzymes in benzo(a)pyrene induced lung carcinogenesis in swiss albino mice[J]. *Mol Cell Biochem*, 2005, 271: 101-106.
- [11] Neubauer H, Clare S E, Kurek R, Fehm T, Wallwiener D, Sotlar K, et al. Breast cancer proteomics by laser capture microdissection, sample pooling, 54-cm IPG IEF, and differential iodine radioisotope detection [J]. *Electrophoresis*, 2006, 27: 1840-1852.
- [12] Wool I G. Extraribosomal functions of ribosomal proteins[J]. *Trends Biochem Sci*, 1996, 21: 164-164.
- [13] Kaneko M, Nomura Y. ER signaling in unfolded protein response[J]. *Life Science*, 2003, 74: 199-205.
- [14] Casini A, Winum J Y, Montero J L, Scozzafava A, Supuran C T. Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibition of cytosolic isozymes and with sulfamide derivatives[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, 13: 837-840.
- [15] Casey J R, Morgan P E, Vullo D, Scozzafava A, Mastrolorenzo A, Supuran C T. Carbonic anhydrase inhibitors. Design of selective, membrane-impermeant inhibitors targeting the human tumor-associated isozyme [J]. *J Med Chem*, 2004, 47: 2337-2347.
- [16] Meng Z, Lou Z, Liu Z, Li M, Zhao X, Bartlam M, et al. Crystal structure of human pyrroline-5-carboxylate reductase[J]. *J Mol Biol*, 2006, 359: 1364-1377.
- [17] Herzfeld A, Greengard O. Enzyme activities in human fetal and neoplastic tissues[J]. *Cancer*, 1980, 46: 2047-2054.
- [18] Edelstein C, Kaiser M, Piras G, Scanu A M. Demonstration that the enzyme that converts precursor of apolipoprotein A-I to apolipoprotein A-I is secreted by the hepatocarcinoma cell line Hep G2[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1988, 267: 23-30.

[本文编辑] 孙岩