

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00006

• 专题报道 •

乙型肝炎病毒相关肝癌血清差异表达蛋白的筛选、鉴定及其诊断价值

刘丽杰^{1△}, 王文静^{2△}, 王占峰³, 陆 晔², 吴 诚¹, 廖 萍², 朱 樑^{1*}

1. 第二军医大学长征医院消化内科, 上海 200003

2. 上海市疾病预防控制中心, 上海 200336

3. 中国科学技术大学统计与金融系, 合肥 230026

[摘要] **目的:** 筛选、鉴定乙型肝炎病毒(HBV)相关肝癌的血清差异表达蛋白, 探讨其可能的早期诊断价值。**方法:** 采用蛋白芯片及表面增强激光解析电离飞行时间质谱(surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, SELDI-TOF-MS)技术对正常人、HBV 相关肝炎、肝硬化患者及原发性肝癌患者术前血清分别进行检测, 筛选肝癌血清差异表达蛋白; 通过离子交换柱分离纯化其中表达差异最明显的蛋白, 并进行质谱鉴定。根据筛选结果, 建立肝癌诊断决策树模型, 评价其诊断肝癌的准确性和敏感度。**结果:** 与正常组相比, 肝癌组有 44 个差异蛋白质波峰($P<0.05$), 其中 21 个上调, 23 个下调; 与肝硬化组相比, 肝癌组有 51 个差异蛋白质波峰($P<0.05$), 其中 47 个上调, 4 个下调。质荷比为 5 805 的蛋白质表达在正常人群<慢性肝炎组<肝硬化组<肝癌组, 在肝癌组中表达最高, 差异具有统计学意义($P<0.01$); 对其酶解消化产物进行肽指纹谱(PMF)鉴定发现其中有 2 条肽段序列与硫酸软骨素合酶 II 部分序列相匹配。根据筛选的差异表达蛋白成功建立肝癌诊断决策树模型, 其判断肝癌的准确率为 94.82%[(23+32)/58]、敏感性 88.46%(23/26)、特异性 100%(32/32)。**结论:** 成功筛选 HBV 相关肝癌血清差异表达蛋白, 其中差异最显著蛋白(质荷比为 5 805)酶解产物中有 2 条肽段与硫酸软骨素合酶 II 部分序列相匹配; 根据筛选结果建立的肝癌诊断决策树模型有助于早期诊断 HBV 相关肝癌。

[关键词] 肝肿瘤; 肿瘤标志物; 乙型肝炎病毒; SELDI-TOF-MS

[中图分类号] R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2008)01-0006-05

Detection, identification and diagnostic value of differential proteins in sera of patients with HBV-related primary hepatic carcinoma

LIU Li-jie^{1△}, WANG Wen-jing^{2△}, WANG Zhan-feng³, LU Ye², WU Cheng¹, LIAO Ping², ZHU Liang^{1*}

1. Department of Gastroenterology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 20003, China

2. Shanghai Center for Disease Prevention and Control, Shanghai 200336

3. Department of Statistics and Finance, University of Science and Technology of China, Hefei 230026

[ABSTRACT] **Objective:** To detect and identify differentially expressed proteins in the sera of patients with HBV-related primary hepatic carcinoma and discuss their possible role in early diagnosis of primary hepatic carcinoma. **Methods:** The surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectroscopy (SELDI-TOF-MS) was used to screen for the differentially expressed serum proteins in patients with HBV-related primary hepatic carcinoma, liver cirrhosis, chronic hepatitis, and healthy adults. Then the most differential protein sample was isolated and purified by ionic exchange chromatography and was subjected to mass spectrometry analysis. The screening results were used to establish a diagnosis model for hepatic carcinoma and the accuracy and sensitivity of the model were assessed. **Results:** CM10(weak cation exchange)chip found 44 differentially expressed protein peaks ($P<0.05$) in hepatic carcinoma group compared with those in the healthy adult group, with 21 up-regulated and 23 down-regulated. Fifty-one differential peaks were identified in hepatic carcinoma group compared with those in the liver cirrhosis group ($P<0.05$), with 47 up-regulated and 4 down-regulated. The expression of protein with a mass-to-charge ratio (m/z) of 5 805 gradually increased in order in the healthy adult, chronic hepatitis, liver cirrhosis and hepatic carcinoma patients; and the

[收稿日期] 2007-06-15 **[接受日期]** 2007-12-15

[基金项目] 上海市科学技术委员会资助项目(034119832); 上海市科技发展基金项目(011209014). Supported by Shanghai Science and Technology Committee(034119832) and Shanghai Science and Technology Development Fund(011209014).

[作者简介] 刘丽杰, 硕士生, E-mail: liulijie1978@126.com; 王文静, 博士, 副主任医师, E-mail: wwjcde@hotmail.com. △ 共同第一作者 (Co-first authors)

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-63610109-73181, E-mail: czzhuliang@126.com

expression in hepatic carcinoma group was significantly higher than that in the healthy adult group ($P<0.01$); peptide mass fingerprint (PMF) after enzyme hydrolysis showed that 2 of the peptides were partially identical to chondroitin sulfate synthase 2. A diagnosis model of hepatic carcinoma was successfully established based on the differentially expressed proteins, with an accuracy of 94.82% ($[23+32]/58$), a sensitivity of 88.46% (23/26), and a specificity of 100% (32/32). **Conclusion:** We have successfully screened out the differentially expressed proteins in the sera of patients with HBV-related primary hepatic carcinoma; the most differentially expressed protein (5805) has 2 peptides partially identical to chondroitin sulfate synthase 2 in sequence. The established model may help to diagnose HBV-related primary hepatic carcinoma.

[KEY WORDS] primary hepatic carcinoma; tumor marker; hepatitis B virus; SELDI-TOF-MS

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(1): 6-10]

我国是乙型肝炎病毒 (HBV) 性肝炎的高发国家, 乙肝后肝硬化是导致肝癌最大的危险因素之一^[1]。肝癌恶性程度较高, 多数患者确诊时已到晚期, 无法进行有效的治疗, 因此, 早期诊断、及时治疗对其预后具有重要的意义^[2]。目前肝癌的临床诊断主要依赖于影像学证据、血清学指标及肝脏穿刺组织的病理组织学和细胞学检查。其中影像学方法无法准确判断占位的良恶性, 而肝脏穿刺病理学检查是有创检查, 存在很多并发症, 所以临床主要依赖于血清学指标早期诊断肝癌。目前常用的血清学指标主要包括甲胎蛋白 (alpha-fetoprotein, AFP)、 α -L-岩藻糖苷酶等, 但各自的诊断特异性和敏感度不是很强, 所以有必要寻找新的肝癌血清学早期诊断标志物。

表面增强激光解析电离飞行时间质谱技术 (surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, SELDI-TOF-MS) 是一种基于蛋白质芯片和质谱技术的蛋白质指纹图谱分析平台, 可直接在芯片上进行样品前处理, 芯片上所设计的不同特性化合物可与样本中特定的蛋白质结合, 适合不同来源的样品比较^[3]; 而且, 其对检测到的蛋白可以直接在芯片上测序, 使差异蛋白的鉴定成为可能^[4-5]。SELDI-TOF-MS 技术可以将血清中存在的近万种蛋白质按照其相对分子质量以质谱图谱的形式加以分析。在血清流行病学调查的基础上, 国内外已经采用此方法和技术手段筛选了卵巢癌、乳腺癌、肺癌、前列腺癌等肿瘤的血清特异性蛋白质生物标志物, 其中的卵巢癌血清特异性蛋白质生物标志物已经获得美国 FDA 的认证^[6-10]。

本研究应用 SELDI-TOF-MS 技术对正常人、HBV 相关肝炎、乙肝后肝硬化患者及乙肝相关原发性肝癌患者术前血清分别进行检测, 对比筛选肝癌血清差异表达蛋白, 对差异蛋白进行分离纯化及质谱鉴定, 并评价其对肝癌的早期诊断价值。

1 材料和方法

1.1 临床资料 选择 2004 年 6 月至 2006 年 6 月

间第二军医大学长征医院肝移植科、消化内科、感染科住院的 HBV 相关原发性肝癌患者 (肝癌组, $n=26$)、乙肝后肝硬化患者 (肝硬化组, $n=30$)、慢性乙型肝炎患者 (慢性肝炎组, $n=30$), 另选同期在本院查证证实健康的体检者 32 例作为正常对照 ($n=32$)。所有肝病患者均经肝脏穿刺或手术切除后病理检查证实, 临床 HBeAg (+) 或 HBV DNA 定量 $>10^3$ copies/ml, 3 个月内均未输血; 排除合并丙型肝炎、丁型肝炎, 排除可能合并血吸虫肝病和 (或) 酒精性肝病。肝癌患者采集标本前未经手术、化疗、放疗等治疗。

肝癌组患者, 男 16 例, 女 10 例, 年龄 35~70 岁, 平均 (55.7 ± 11.9) 岁; 肝硬化组患者, 男 18 例, 女 12 例, 年龄 34~66 岁, 平均 (48.5 ± 9.67) 岁; 慢性肝炎组患者, 男 17 例, 女 13 例, 年龄 23~60 岁, 平均 (38.3 ± 9.48) 岁; 正常对照组: 男 18 例, 女 14 例, 年龄 22~56 岁, 平均 (36.4 ± 13.19) 岁。

1.2 主要试剂及仪器 SELDI-TOF-MS 及配套蛋白质芯片 CM10 (弱阳离子交换)、强阴离子交换柱 Q (简称 Q-bead)、芥子酸 (SPA) 均为美国赛弗吉公司 (Ciphergen Biosystems) 产品。尿素、乙腈、三氟乙酸购自 Sigma 公司, 异丙醇 (DMC) 购于上海化学试剂公司。U9 缓冲液 (9 mol/L urea, 2% CHAPS, 1% DTT), U1 缓冲液 (用 pH 9.0 的 50 mmol/L Tris · HCl 缓冲液 9 倍稀释 U9 缓冲液而成)。CM10 缓冲液 (150 mmol/L NaAC, pH 3.0), Organic buffer 液 (异丙醇 1.65 ml、ACN 0.85 ml、TFA 0.05 ml, 去离子水溶解, 混匀, 定容至 5 ml)。

1.3 样本获取及蛋白芯片技术筛选肝癌差异表达蛋白 受检者抽取清晨空腹静脉血 3 ml, 4℃ 静置 2 h 自然凝固后, 4℃ $3\,000 \times g$ 离心 15 min, 取上层血清, 再次 4℃ $3\,000 \times g$ 离心 5 min, 分装后 -80℃ 冰箱保存。实验检测血清均仅 1 次冻融。蛋白质芯片每孔加入 150 mmol/L NaAC (pH 3.0) 稀释, 室温下水平摇床孵育 5 min, 重复 1 次; 取 200 μ l 稀释后的血清 (40 倍) 上样, 水平摇床上孵育 90 min, 去样

品,150 mmol/L NaAC(pH 3.0)每孔 200 μ l 洗脱 2 次,每次 5 min。去离子水每孔 300 μ l 冲洗 1 次。取下芯片,室温下风干后每孔加入 0.5 μ l SPA(1%三氟乙酸 75 μ l+乙腈 75 μ l)风干,重复 1 次。在 SELDI-TOF 质谱阅读器(PBS-II c, CIPHERGEN Biosystems)中进行质谱分析(激光强度 150、探测器检测灵敏度为 7),筛选差异表达蛋白。

1.4 差异显著蛋白的分离纯化 筛选结果发现,质荷比为 5 805 的蛋白在各组中差异最显著,选取其进行分离纯化鉴定。取肝癌患者及正常对照血清各 300 μ l,加入 450 μ l U9,750 μ l U1,混匀 10 min,4℃ 冰箱保存备用。吸取 250 μ l Q-bead 至 2.5 ml Eppendorf 管中,依次加入去离子水、50 mmol/L Tris·HCl (pH 9.0)和 1 200 μ l U1,分别混匀 10 min,离心去上清。

将准备好的样品加入处理过的 Q-bead 中,4℃ 混匀 30 min,离心取上清,得第 1 个组分,在沉淀中加入 50 mmol/L Tris·HCl(pH 9.0),混匀 10 min,离心取上清,得第 2 个组分,之后依次加入 pH 值分别为 7.0、6.0、5.0、4.0 和 3.0 的 20 mmol/L Na_2HPO_4 进行梯度洗脱,4℃ 混匀 10 min,离心取上清,先后得到余下 5 个组分,最后加入 100 μ l Organic buffer,4℃ 混匀 10 min,离心取上清。每组共计得到 8 个组分。用 NP20 芯片进行检测,每孔上样 1 μ l,立刻加 1 μ l SPA 吸打几次后,42℃ 加热干燥,再加 1 μ l SPA,干燥后读片。

1.5 差异显著蛋白的酶解鉴定及肽指纹谱(PMF)分析 用 CM10 芯片验证含质荷比(相对分子质量)为 5 805 蛋白的组分,胰蛋白酶芯片上原位酶解,通

过搜索 Mascot 数据库(Matrix Science, London, UK),在 ExPASy molecular biology server 的 Swiss-Prot 数据库中寻找该蛋白的信息及功能。通过比较经胰酶消化 5、25 min 后的蛋白图谱,选定质荷比分别为 3 885.4、4 647.5、5 153.1、5 339、5 679 的 5 个蛋白峰为限定条件,在 Swiss-Prot 数据库中对蛋白序列和相对分子质量与人类相近的已知蛋白进行比较,接受的标准包括序列覆盖的程度、相对分子质量及肽匹配的评分(MOWSE),评分 ≥ 55 分为有意义的结果。

1.6 建立肝癌诊断决策树模型 选择正常对照人群及肝癌患者差异表达蛋白,应用 CIPHERGEN 公司 Bio-marker Pattern Software(BPS)建立肝癌诊断决策树模型,并评价其判断肝癌的准确率、敏感性和特异性。

1.7 统计学处理 用 CIPHERGEN ProteinChip 3.1.1 软件自动采集数据,收集数据范围 1 000~30 000,优化范围 2 000~20 000。以质控血清作重复检测。将所有样品的血清蛋白质谱标准化后,用 BioMarker Wizard 软件分析,设定有意义的峰出现频率阈值为 20%,信号噪声比(signal-to-noise ratio, S/N)最低值为 5,对各组进行统计学分析,对组间蛋白峰强度进行比较, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 血清标本蛋白质芯片检测 标准化后的蛋白质图谱分析(图 1)表明,每例标本在质荷比 1 000~30 000 范围内均能检测出 290 个左右蛋白峰,其中质荷比处于 1 000~10 000 者约 253 个,10 000~20 000 者约 23 个,20 000~30 000 者约 18 个。

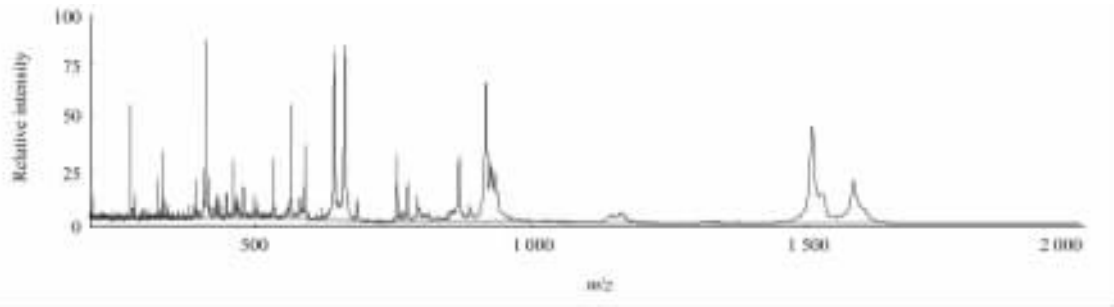


图 1 正常对照样品标准化后的蛋白质波峰图

Fig 1 The protein peaks of healthy control group after standardization

2.2 肝癌血清中的差异表达蛋白 筛选结果发现:与正常组相比,肝癌组有 44 个蛋白质波峰强度值有统计学差异($P<0.05$),其中 21 个上调,23 个下调;与肝硬化组相比,肝癌组有 51 个蛋白质波峰的强度

值有统计学差异($P<0.05$),其中 47 个上调,4 个下调。其中,质荷比为 5 805 的蛋白质在正常人群组、慢性肝炎组、肝硬化组及肝癌组中表达逐渐增高,且在肝癌组中表达最高,与正常组相比,差异具有统计

学意义($P=4.22\times10^{-6}$)。详见表 1。

表 1 质荷比为 5 805 的蛋白在各组中的表达

Group	n	m/z	Strength of peak
Healthy adult	32	5 805.89	1.11±1.07
Chronic hepatitis	30	5 805.40	1.16±1.02
Liver cirrhosis	30	5 805.41	9.17±8.60 **
Primary hepatic carcinoma	26	5 805.49	11.63±10.91 **

** $P<0.01$ vs healthy adult group

2.3 差异显著蛋白的分离纯化及酶解结果 由于质荷比为 5 805 的蛋白在肝癌组及正常组间差异最显著,故选择其进行鉴定。对肝癌及正常对照组的 8 个组分进行检测,肝癌组 pH 6.0 组分中发现质荷比为 5 805 的蛋白峰,正常组各组分均未出现该蛋白峰。芯片上原位酶解后,得到质荷比为 5 805 的蛋白在肝癌组中表达明显上调,且芯片上胰酶消化 5 min 的波峰强度明显高于消化 25 min,而正常组中未见质荷比 5 805 蛋白的表达(图 2)。

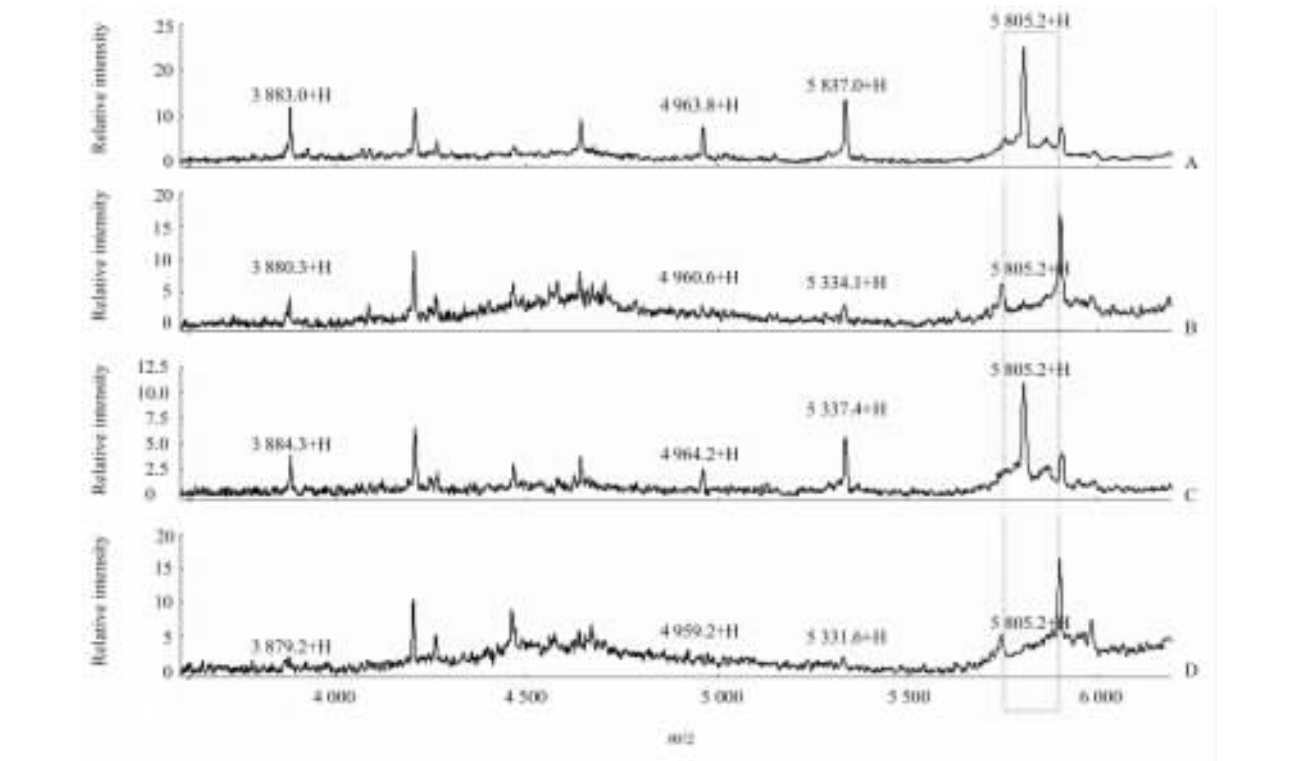


图 2 正常及肝癌组显著差异表达蛋白的酶解分析结果

Fig 2 Differentially expressed serum proteins in healthy adult and primary hepatic carcinoma groups

A: The spectra of primary hepatic carcinoma 5 min after trypsinization on-chip; B: The spectra of healthy adult 5 min after trypsinization on-chip; C: The spectra of primary hepatic carcinoma 25 min after trypsinization on-chip; D: The spectra of healthy adult 25 min after trypsinization on-chip

2.4 差异显著蛋白的 PMF 鉴定结果 蛋白酶解产物中有 2 条肽段与硫酸软骨素合酶 II (chondroitin sulfate synthase-2) 部分序列相匹配,评分 55 分,相对分子质量分别为 4 647.5、3 885.4,前者氨基酸序列为 R. LTVLLPLAA AERDLAPGFLEAFATA-ALEPGDAAAAL TLLLLYEPR. Q, 后者为 R. DLAPGFLEAFATAALEPGDAAAAL TLLLLYEPR QAQR. V, 下划线处为 2 条肽段重叠的序列。

2.5 肝癌诊断决策树模型的建立 BPS 自动选用质荷比 2 212、5 808、3 218、3 264 成功建立肝癌诊断决策树模型,此决策树具有 4 层 4 个叶节点,58 例样本(原发性肝癌患者及正常对照人群)在根节点处被 2 212(节点 1)标志蛋白划分为 2 组,24 例判断为对

照,峰值≤5.64 的 34 例样本判断为肝癌进入节点 2;用 5 808 标志蛋白划分,13 例判断为对照,21 例判断为肝癌;峰值≤5.88 的进入节点 3,用 3 218 标志蛋白划分,8 例判断为对照,13 例判断为肝癌;峰值≤20.73 的进入节点 4,后用 3 264 标志蛋白划分,2 例判断为对照,11 例判断为肝癌。该决策树模型判断肝癌的准确率为 94.82%[(23+32)/58],敏感性为 88.46%(23/26),特异性为 100%(32/32)。

3 讨论

SELDI-TOF-MS 技术是蛋白质组学研究中一种全新的技术平台,它集分离纯化和质谱检测于一身,为蛋白质组学研究提供了全新的技术平台^[11]。该技

术具有质谱技术的高分辨率和高灵敏度的优势,还可直接检测未经处理的尿液、血液、脑脊液、关节腔液、支气管洗出液、细胞裂解液和各种分泌物等,操作相对简便,并可同时进行多样品、多蛋白的检测,已在肿瘤生物标志物筛选和发病机制探讨方面取得突破性进展^[12]。

本研究应用蛋白质芯片技术检测了26例肝癌、30例肝硬化、30例肝炎及32例正常对照的外周血清,发现了294个差异表达的蛋白质峰。肝癌组与正常对照有44个波峰的强度值有统计学差异,其中21个峰在肝癌组升高,23个峰在肝癌组降低。采用波谱模型软件分析,以质荷比为2 212、5 808、3 218及3 264的蛋白质建立了肝癌诊断决策树模型,并对其诊断价值进行分析,结果发现,该决策树模型判断肝癌的准确率为94.82%、敏感性为88.46%、特异性100%。SELDI-TOF-MS技术测定的最适相对分子质量在50 000以下^[13],这也是本研究未能检测到AFP(相对分子质量约69 000)的原因。

硫酸软骨素(chondroitin sulfate)是广泛分布于细胞外间质中的一种糖胺多糖大分子,是由双糖单位组成的聚合物,具有抗关节炎、免疫抑制、降脂抗凝等作用^[14],是目前相关研究的热点。正常肝脏中硫酸乙酰肝素含量最多,而在肝纤维化时硫酸软骨素的含量增加。慢性肝炎伴肝纤维化改变时,肝组织细胞外基质大量增生,硫酸软骨素亦大量合成并发生异常堆积,造成局部高硫酸软骨素环境。本研究筛选结果发现,肝癌组患者血清中相对分子质量为5 805的蛋白表达程度最高,对其进行分离纯化,并进行质谱鉴定。结果发现其酶解产物中有2条肽段的氨基酸序列与硫酸软骨素合酶Ⅱ部分序列相匹配。硫酸软骨素合酶Ⅱ是在硫酸软骨素糖基转移酶家族中发现的第5个酶^[15],并且在硫酸软骨素合成的不同阶段发挥作用。

本研究利用SELDI-TOF-MS技术检测和比较了HBV相关肝癌、肝硬化、慢性肝炎患者及正常对照人群蛋白质差异表达图谱,筛选出肝癌差异表达蛋白,成功建立了利于肝癌诊断的决策树模型,值得进一步研究以应用于早期诊断肝癌;筛选结果发现相对分子质量为5 805的蛋白质差异表达最显著,其酶解产物中有2条肽段的氨基酸序列与硫酸软骨素合酶Ⅱ的部分序列较一致,但其具体功能仍有待进一步的研究确定。

(志谢 本研究得到复旦大学中山医院康晓楠医生、军事医学科学院附属医院临床药理学教研室郭军华教授的技术支持和无私帮助,在此一并表示

感谢!)

[参考文献]

- [1] Perz J F, Armstrong G L, Farrington L A, Hutin Y J, Bell B P. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide[J]. *J Hepatol*, 2006, 45: 529-538.
- [2] Chang K W, Yang P Y, Lai H Y, Yeh T S, Chen T C, Yeh C T. Identification of a novel actin isoform in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatol Res*, 2006, 36: 33-39.
- [3] Hoeben A, Landuyt B, Botrus G, De Boeck G, Guetens G, Highly M, et al. Proteomics in cancer research: methods and application of array-based protein profiling technologies[J]. *Anal Chim Acta*, 2006, 564: 19-33.
- [4] Liotta L A, Ferrari M, Petricoin E. Clinical proteomics: written in blood[J]. *Nature*, 2003, 425: 905.
- [5] Liotta L A, Kohn E C. The microenvironment of the tumour-host interface[J]. *Nature*, 2001, 411: 375-379.
- [6] Petricoin E F, Liotta L A. Proteomic analysis at the bedside: early detection of cancer[J]. *Trends Biotechnol*, 2002, 20 (12 Suppl): S30-S34.
- [7] Qu Y, Adam B L, Yasui Y, Ward M D, Cazares L H, Schellhammer P F, et al. Boosted decision tree analysis of surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectral serum profiles discriminates prostate cancer from noncancer patients[J]. *Clin Chem*, 2002, 48: 1835-1843.
- [8] Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, Wang Y Y, Chan D W. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer[J]. *Clin Chem*, 2002, 48: 1296-1304.
- [9] Petricoin E F, Ardekani A M, Hitt B A, Levine P J, Fusaro V A, Steinberg S M, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer[J]. *Lancet*, 2002, 359: 572-577.
- [10] Adam B L, Qu Y, Davis J W, Ward M D, Clements M A, Cazares L H, et al. Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men[J]. *Cancer Res*, 2002, 62: 3609-3614.
- [11] El-Anead A, Banoub J. Proteomics in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: focus on high risk hepatitis B and C patients [J]. *Anticancer Res*, 2006, 26(5A): 3293-3300.
- [12] Henderson N A, Steele R J. SELDI-TOF proteomic analysis and cancer detection[J]. *Surgeon*, 2005, 3: 383-390, 422.
- [13] He Q Y, Chiu J F. Proteomics in biomarker discovery and drug development[J]. *J Cell Biochem*, 2003, 89: 868-886.
- [14] Izumikawa T, Uyama T, Okuura Y, Sugahara K, Kitagawa H. Involvement of chondroitin sulfate synthase-3 (chondroitin synthase-2) in chondroitin polymerization through its interaction with chondroitin synthase-1 or chondroitin-polymerizing factor [J]. *Biochem J*, 2007, 403: 545-552.
- [15] Kitagawa H, Izumikawa T, Uyama T, Sugahara K. Molecular cloning of a chondroitin polymerizing factor that cooperates with chondroitin synthase for chondroitin polymerization[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 23666-23671.

[本文编辑] 贾泽军