

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00269

## 嗅球蛋白 1 在肺癌组织中的表达及可能意义

吴玲玲<sup>1</sup>, 余永伟<sup>2</sup>, 谭晓洁<sup>1</sup>, 常文军<sup>1</sup>, 苏彤<sup>1</sup>, 曹付傲<sup>3</sup>, 曹广文<sup>1\*</sup>

1. 第二军医大学基础部流行病学教研室, 上海 200433

2. 第二军医大学长海医院病理科, 上海 200433

3. 第二军医大学长海医院普通外科, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 通过对比嗅球蛋白 1(OLFM1)基因及其蛋白在肺癌组织及其配对的正常肺组织中的表达情况, 探讨其表达与肺癌发生的相互关系。**方法** 分别采用半定量 RT-PCR 法和荧光实时定量 PCR 检测 21 例肺癌患者的原位肺癌组织及其配对正常肺组织中 OLFM1 基因的相对表达变化和相对表达量, 应用免疫组织化学染色观察 OLFM1 蛋白在组织中的表达。**结果** OLFM1 基因在 8 例肺鳞癌原发灶中的表达相对于其配对正常组织中的表达显著下调约 2.2 倍( $P=0.028$ ); OLFM1 蛋白定位于肺腺癌细胞胞质, 仅在肺腺癌表达( $P<0.001$ ), 其表达在不同年龄、性别、肿瘤分期、分化程度间差异均无统计学意义( $P>0.05$ )。**结论** OLFM1 基因肺鳞癌中表达下调, 可能是一个潜在的分子标志; 而 OLFM1 蛋白仅在肺腺癌表达, 在肺鳞癌和正常组织中均不表达, 这提示不同病理组织类型肺癌的发生可能有不同的发生机制和途径。

**[关键词]** 肺肿瘤; 腺癌; 鳞状细胞癌; OLFM1 基因; 免疫组织化学

**[中图分类号]** R 734.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2010)03-0269-05

### Expression of OLFM1 protein in lung cancer tissue and its significance

WU Ling-ling<sup>1</sup>, YU Yong-wei<sup>2</sup>, TAN Xiao-jie<sup>1</sup>, CHANG Wen-jun<sup>1</sup>, SU Tong<sup>1</sup>, CAO Fu-ao<sup>3</sup>, CAO Guang-wen<sup>1\*</sup>

1. Department of Epidemiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Pathology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

3. Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the relationship of OLFM1 expression with the development of lung cancer by comparing the OLFM1 expression in lung cancer specimens and matched normal lung specimens. **Methods** The OLFM1 mRNA expression was examined by semi-quantitative RT-PCR and fluorescence quantitative PCR in 21 lung cancer tissues and the paired normal lung tissues, and the protein expression of OLFM1 was detected by immunohistochemistry. **Results** The OLFM1 mRNA expression levels in 8 primary lung squamous cell carcinoma tissues were decreased by 2.2 folds compared with that in the matched normal lung tissues, with the difference being significantly different ( $P=0.028$ ). The OLFM1 protein was located in cytoplasm and only expressed in lung adenocarcinoma tissues ( $P<0.001$ ), and the expression was not associated with patients' age, gender, tumor stage, and differentiation degrees ( $P>0.05$ ). **Conclusion** The lower expression of OLFM1 gene in lung squamous cell carcinoma may serve as a potential molecule marker for the condition. The expression of OLFM1 protein in lung adenocarcinoma, but not in lung squamous cell carcinoma and normal lung tissue, may suggest that different pathological types of lung cancers may have different pathological mechanisms.

**[Key words]** lung neoplasms; adenocarcinoma; squamous cell cancer; OLFM1 gene; immunohistochemistry

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(3):269-273]

肺癌是常见的恶性肿瘤, 在肺癌标化发病率和标化死亡率统计中, 肺癌均居恶性肿瘤的第一位, 不同种族发病率有所不同<sup>[1]</sup>。在我国, 肺癌也是威胁人民生命健康最为严重的恶性肿瘤, 肺癌的早期诊断和及时治疗是延长五年生存期的关键。肿瘤的血

清学筛查由于方便快捷、简单无创, 成为近年来的研究热点。而我们教研室前期成功地构建了包含多种肺癌组织类型的噬菌体展示肽库, 并应用肺癌患者混合血清和正常对照血清从肽库中筛选出与肺癌患者血清中抗体反应阳性且与正常对照血清中抗体反

**[收稿日期]** 2009-10-22 **[接受日期]** 2010-01-26

**[基金项目]** 上海市登山计划重大课题(06DZ19503)。Supported by Mountain Climbing Project of Shanghai Municipality(06DZ19503)。

**[作者简介]** 吴玲玲, 硕士生。E-mail: spirit50@sohu.com

\* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 021-81871060, E-mail: gcao@smmu.edu.cn

应阴性的噬菌体克隆<sup>[2]</sup>。这些噬菌体克隆表面所展示的肽段可能是某种肺癌特异性抗原的抗原决定簇,能与肺癌患者血清中由于抗原刺激所产生的自身抗体发生抗原抗体反应。嗅球蛋白(OLFM1)就是我们所筛选的其中一个噬菌体克隆。

OLFM1 为分泌糖蛋白,正常组织表达谱的结果表明其 mRNA 仅在脑组织大量表达<sup>[3]</sup>,在神经组织的发育中扮演极其重要的角色,与神经嵴的形成紧密相关,而在其他组织中表达量很低<sup>[4]</sup>。而 OLFM1 表达的异常与许多神经系统肿瘤有关,如恶性胶质瘤<sup>[5]</sup>、神经纤维瘤、催乳素瘤等<sup>[6]</sup>。在其他系统肿瘤的研究中,也有 OLFM1 相关的报道,如 OLFM1 在滑膜肉瘤中相对于正常组织出现高表达<sup>[7]</sup>,而在子宫内膜癌中相对于正常子宫内膜低表达(下调约10.7倍)<sup>[8]</sup>。有研究<sup>[9]</sup>表明 OLFM1 的低表达与细支气管肺泡癌肿瘤的浸润和恶性程度有关,但其仅是通过对比不同浸润程度的肺腺癌基因转录水平的差异而得出的结论,尚有待证实。本研究通过对比 OLFM1 基因在肺癌组织及其配对的正常肺组织的转录水平及其蛋白表达水平,探索肺癌早期筛选和诊断的新方法,并为肺癌的发生、发展机制提供一个新的线索。

1 材料和方法

1.1 标本来源 选取 2008 年 7 月到 2009 年 3 月第二军医大学长海医院手术切除的 21 例经病理确诊的肺癌患者肿瘤组织及相应距肿瘤边缘>5 cm 的癌旁正常肺组织。其中男 16 例、女 5 例;组织类型 13 例为腺癌,8 例为鳞癌。另外 10 例没有配对正常组织的肺腺癌组织也纳入 OLFM1 蛋白表达水平的研究,其中男 5 例、女 5 例。年龄 37~88 岁,平均(59.68±12.70)岁。标本于手术后立即取下,投于液氮中,随后转入-80℃低温冰箱保存备用。所选用的病例均经过病理验证组织类型。所选取的组织样本患者信息见表 1。

1.2 半定量 RT-PCR 应用传统 TRIzol(Intravagen)法提取 21 对肺癌及相应癌旁组织样本的总 RNA,并经紫外分光光度计定量和琼脂糖凝胶电泳证实其质量及完整性。根据 D<sub>260</sub> 定量,应用 RNA 逆转录酶(promega)合成 cDNA 的第一链,反应体系为 20 μl,含 1 μg 的总 RNA,0.4 μl 的逆转录酶,1 μl Oligo(dT)逆转录引物,其余按照逆转录试剂盒说明书操作,所得 cDNA 置-20℃保存。利用 NCBI 上 OLFM1 基因的 mRNA 序列,应用 Primer 5 设计 OLFM1 基因引物。上游引物序列:5'-CCA TGTG TTC ACG GGA TGC-3';下游引物:5'-GCC AGG TGT TGC TTA TGA CTC T-3'。反应体系为 50 μl,其中根据 GAPDH 调整

初始的模板量,5 μl Buffer,1 μl dNTP,2 μl 引物,Taq plus 酶 1.25 U。PCR 反应条件:95℃预变性 3 min;94℃ 1 min,56℃退火 50 s,72℃延伸 1 min,循环数 30,最后 72℃补齐 10 min。反应产物经 2%琼脂糖凝胶 120 V 电泳 30 min,应用溴化乙啶染色,在 Bio-Rad 凝胶成像系统(Bio-Rad 公司)观察。Taq plus 酶、dNTP、Buffer 均来自 TaKaRa 生物工程有限公司。

表 1 所用组织样本的临床病理信息

Tab 1 Clinical and pathological information of lung cancer patients

Patient ID	Gender	Age (year)	Pathological type	Differentiation	Tumor stage <sup>△</sup>
639999	M	61	Adenocarcinoma	NA	T <sub>2a</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>
631430	M	62	SCC	NA	NA
639975	M	65	SCC	Poorly	T <sub>3</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>
639928	M	87	Adenocarcinoma	NA	T <sub>2</sub> N <sub>2</sub> M <sub>0</sub>
638101	F	46	Adenocarcinoma	Moderatly	T <sub>2b</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>
631633	M	40	Adenocarcinoma	Moderatly	T <sub>2b</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>
631598	M	67	SCC	Moderatly	T <sub>2a</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>
631742	M	74	SCC	NA	T <sub>2b</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>
637214	M	62	Adenocarcinoma	Moderatly	T <sub>3</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>
637402	M	74	Adenocarcinoma	Moderatly	T <sub>2a</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>
631455	M	57	SCC	Poorly	T <sub>2a</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>
630704	F	58	Adenocarcinoma	Moderatly	T <sub>3</sub> N <sub>2</sub> M <sub>0</sub>
637273	M	69	Adenocarcinoma	Poorly	T <sub>2b</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>
636969	F	67	Adenocarcinoma	NA	T <sub>1b</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>
636867	M	57	Adenocarcinoma	Poorly	T <sub>3</sub> N <sub>2</sub> M <sub>0</sub>
641376	M	45	SCC	Poorly	T <sub>1b</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>
642334	M	62	Adenocarcinoma	Moderatly	T <sub>2a</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>
638362	M	56	SCC	Moderatly	T <sub>2</sub> N <sub>2</sub> M <sub>0</sub>
604038	M	88	SCC	Poorly	NA
632415	F	37	Adenocarcinoma	Poorly	T <sub>2</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>
437027	F	67	Adenocarcinoma	Moderatly	T <sub>1b</sub> N <sub>1</sub> M <sub>0</sub>
648985*	F	47	Adenocarcinoma	Moderatly	NA
649115*	F	44	Adenocarcinoma	Moderatly	T <sub>2</sub> N <sub>2</sub> M <sub>0</sub>
648497*	M	65	Adenocarcinoma	Moderatly	NA
648628*	M	56	Adenocarcinoma	Moderatly	T <sub>2a</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>
640393*	M	47	Adenocarcinoma	Moderatly	NA
649112*	F	44	Adenocarcinoma	Moderatly	T <sub>2b</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>
648485*	F	61	Adenocarcinoma	NA	T <sub>1b</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>
648682*	F	77	Adenocarcinoma	Moderatly	T <sub>2b</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>
649284*	M	50	Adenocarcinoma	Moderatly	T <sub>2</sub> N <sub>2</sub> M <sub>0</sub>
649032*	M	58	Adenocarcinoma	NA	T <sub>2a</sub> N <sub>0</sub> M <sub>0</sub>

NA: Not available;△: UICC 2009;\*: No paired normal lung tissue;SCC:Squamous cell carcinoma

1.3 荧光实时定量 PCR 将逆转录第一条链后的 cDNA 稀释 10 倍后置于-20℃保存。在无核酸污染的 1.5 ml 管,按照下列组合配制 PCR 反应体系:SYBR Premix Ex Taq 10 μl(TaKaRa),PCR primers 8 pmol,模板 2 μl,每个样本重复 3 孔。加样完毕后,用 96 孔板 PCR 贴膜封口,甩板机 2 000 转/min(离心半径 8 cm)离心数秒;将 96 孔板迅速放入预先设好程序的 Lightcycle 480 定量 PCR 仪中,启动扩增过程;反应条件:95℃预变性 1 min;94℃ 30 s,56℃退

火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 循环数为 40。在扩增程序结束后, 以 0.2℃ 间隔从 70℃ 升温至 95℃ 进行熔解曲线分析, 以确定扩增产物的特异性。以 GAPDH 为参考基因来校准目标基因表达, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算基因相对表达倍数, 从而进行相对定量。

**1.4 免疫组织化学染色观察 OLFM1 蛋白表达** 采用 EnVision 二步法进行。取直径约 1 cm 的组织用 10% 甲醛固定后, 进行石蜡包埋。取石蜡块切成 4~6  $\mu\text{m}$  的薄片, 60℃ 过夜使之干燥, 用二甲苯脱蜡。再将切片蒸馏乙醇中水化, 微波炉 121℃ 加热 10 min。切片与 20% 山羊血清孵育 30 min 进行封闭。再与 1:50 稀释的 OLFM1 鼠多克隆抗体 (Abgent, USA) 室温孵育 30 min。再与兔抗鼠标记多聚螯合物酶 (HRP) 的复合物 (Dako, Glostrup, Denmark) 结合, 形成酶-多聚化合物-二抗的巨大复合物, 酶作用于二氨基联苯胺 (DAB) 进行显色定位。

以 PBS 代替第一抗体作为空白对照。根据阳性细胞在全部组织细胞中所占比例以及阳性细胞染色强度判定实验结果: 凡细胞质或细胞核内出现棕黄色细颗粒者为阳性细胞。A: 按显色细胞数记分, 阳性细胞数  $< 1/3$  为 1 分, 阳性细胞数  $1/3 \sim 2/3$  为 2 分, 阳性细胞数  $\geq 2/3$  为 3 分。B: 按细胞显色深浅记分, 无阳性反应细胞为 0 分, 浅黄色为 1 分, 棕黄色

为 2 分, 棕褐色为 3 分。积分数 =  $A \times B$ 。  $A \times B = 0$  判断为 (-),  $A \times B = 1 \sim 2$  判断为 (+),  $A \times B = 3 \sim 4$  判断为 (++) ,  $A \times B = 6 \sim 9$  判断为 (+++)。

**1.5 统计学处理** 采用 SPSS 15.0 软件包, 半定量 RT-PCR 计算相对表达变化四格表精确概率法计算。为克服系统误差, 荧光实时定量 PCR 结果以单份标本检测值与内参的比值, 转换为以 2 为底的对数表示基因的表达水平, 绘制箱图显示上下调状态, 并采用配对  $t$  检验来比较 OLFM1 基因在肺癌组织及其配对正常组织的表达差异。Kruskal-Wallis  $H$  检验来判断肺癌组织与正常肺组织中 OLFM1 蛋白表达是否有差异。

## 2 结果

**2.1 半定量 RT-PCR 计算相对表达变化** 在 21 对肺癌组织和配对正常组织中, 有 10 例原位癌 OLFM1 基因的表达强度高于正常组织, 11 例低于正常组织 (图 1)。用四格表精确概率比较两组 OLFM1 基因相对表达水平有没有显著差异 ( $P = 0.758$ )。通过病理结果分型, OLFM1 基因在腺癌中的表达, 8 例高于正常, 5 例低于正常, 与正常组织相比表达没有差异 ( $P = 0.434$ ), 而在肺鳞癌中 2 例高与正常, 6 例低于正常, 与正常组织相比表达没有差异 ( $P = 0.132$ )。

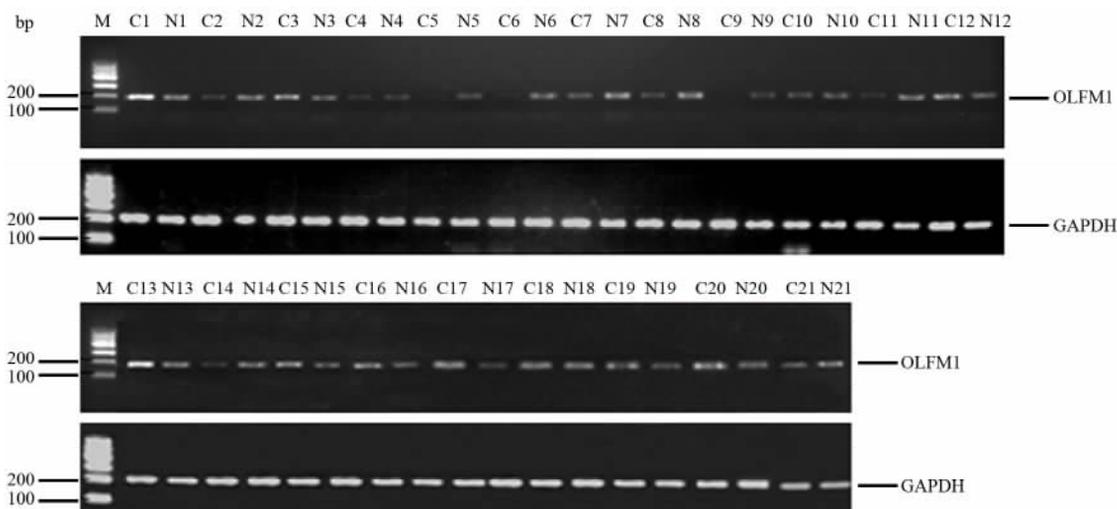


图 1 半定量 RT-PCR 检测肺癌和正常组织中 OLFM1 基因的表达

Fig 1 Expression of OLFM1 in lung cancer and normal specimens by semi-quantitative RT-PCR

M: Marker; C1-8: Lung squamous cell carcinoma; C9-21: Lung adenocarcinoma; N1-21: Matched normal specimens

**2.2 实时荧光定量 PCR 计算相对表达倍数** 荧光实时定量 PCR 发现, OLFM1 基因在肺腺癌原发灶中的表达与正常组织没有差异 ( $P = 0.331$ ), 8 对肺鳞癌原发灶相对于其配对正常组织中的表达显著下调约 2.2 倍 ( $P = 0.028$ )。图 2 中纵轴为上调或下调

倍数的对数值,  $> 0$  表示上调,  $< 0$  表示下调, 横轴代表所验证基因。每个箱图从上到下依次代表所测样本组变化倍数的 95%、75%、50%、25% 和 5% 分位数, 下方圆圈为异常值。

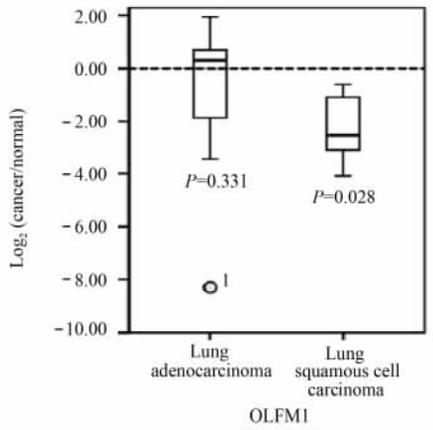


图2 荧光实时定量 RT-PCR 检测肺腺癌和肺鳞癌相对于正常肺组织中 OLFM1 基因的相对表达倍数  
 Fig 2 Relative expression fold of OLFM1 in lung adenocarcinoma and lung squamous cell carcinoma vs paired normal specimens by quantitative RT-PCR

2.3 OLFM1 蛋白在肺癌和正常肺组织中的组织表达 23 例肺腺癌组织中有 13 例(56.5%)腺癌细胞表达 OLFM1, OLFM1 蛋白表达主要定位于腺癌

细胞的胞质,而在腺癌细胞的细胞核和间质均未见表达,且肺腺癌 OLFM1 的表达在年龄、性别、肿瘤分期、分化程度间均无显著差异(表 2,  $P > 0.05$ )。而 8 例肺鳞癌和 21 例正常组织中均无表达( $P < 0.001$ ,图 3)。

表 2 肺腺癌中 OLFM1 蛋白表达与主要临床特点的关系

Tab 2 Relationship between expression of OLFM1 in lung adenocarcinoma and main clinical characteristics

Index	N	Positive
Gender		
Male	13	8
Female	10	5
Age(year)		
≤60	11	7
>60	12	6
Stage(UICC 2009)		
Stage I or II	15	9
Stage III or IV	5	3
Differentiation		
Morderatly	14	8
Poorly	4	1

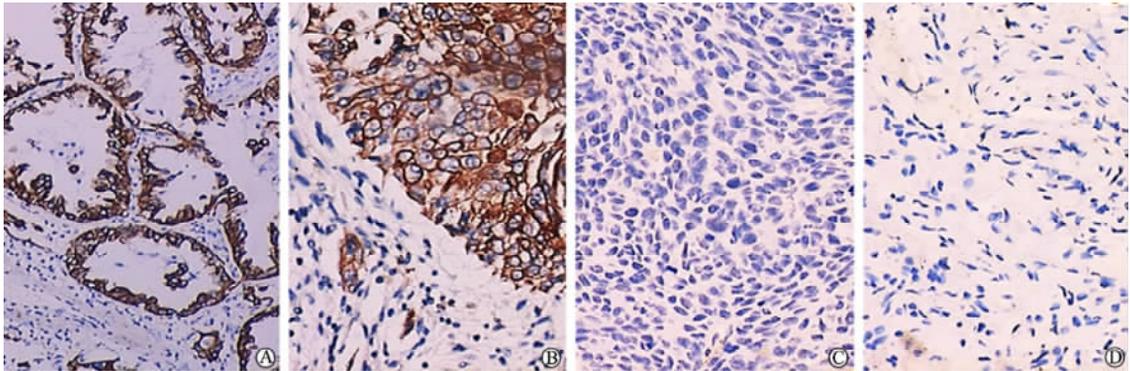


图3 OLFM1 蛋白在不同病理分型肺癌组织中的表达(EnVision)  
 Fig 3 Examination of OLFM1 protein in different tissues of lung cancer

A, B; Adenocarcinoma; C; Squamous cell carcinoma; D; Paired normal lung tissue. Original magnification; ×400

### 3 讨论

肺癌是多年来一直排在首位的恶性肿瘤,致死率高。肺癌病理类型有鳞状细胞癌、腺癌、腺鳞癌、大细胞癌、小细胞癌、类癌、细支气管肺癌等,主要类型为鳞状细胞癌,约占肺癌的 40%,男性约占 80%;腺癌约占肺癌的 20%,女性约占 50%。而近 10 年来肺癌病理类型中腺癌的病例数明显上升,而鳞癌的病例数有所下降,鳞癌患者的吸烟比例高,且肺癌的发病有年轻化的趋势,且女性、腺癌病例有明显增加<sup>[10]</sup>。环境中的烟草烟雾是引起女性肺癌的主要危险因素,另外室内污染,包括烹调产生的高温油

烟和室内燃煤产生的烟雾均增加了肺癌的风险,这在中国女性尤为突出<sup>[11]</sup>。

肺癌发生相关的遗传学分子机制倍受关注。普遍认为细胞增殖失控和细胞凋亡障碍是癌变的根本原因,而抑癌基因在细胞增殖和凋亡中起十分重要的调控作用。目前研究比较清楚的肺癌相关抑癌基因并不多,有 Rb 基因(视网膜母细胞瘤基因)、p53 基因。大多数肿瘤细胞都是由于细胞 Rb 蛋白和 p53 蛋白功能被外界致癌因素和(或)内部变异、突变所干扰,导致细胞周期调节紊乱和凋亡反应阻抑而形成的。研究方法也是多种多样,我们前期则是应用肺癌患者血清和对照血清对肺癌的噬菌体展示

肽库进行血清筛选,从中找出能与肺癌患者血清中自身抗体特异结合的噬菌体克隆,这些克隆所展示的肽段可能是癌组织和正常组织差异表达基因所编码形成的,而 OLFM1 基因就是其中之一。

OLFM1 基因定位于 9q34,它的 mRNA 存在多种选择性剪接异构体,在 ASD (Alternative Splicing Database, <http://www.ebi.ac.uk/asd/>)中报道的就有 11 种之多,其中剪接异构体 1 编码一个 467 个氨基酸的多肽、剪接异构体 2 编码一个 135 个氨基酸的多肽,其余剪接异构体是否编码蛋白及其功能如何仍在论证当中。而已明确的 OLFM1 两种异构体编码的嗅球蛋白为分泌糖蛋白,在神经组织的发育中扮演极其重要的角色。研究表明,通过在细胞内转染含有 OLFM1 基因的质粒,发现细胞出现细胞皱缩、变圆、核周围的染色质浓集等现象,从而认为 OLFM1 基因可能可以介导细胞凋亡<sup>[12]</sup>。另有研究通过细胞周期分析,表明在原因不明复发性流产的子宫内膜细胞中,细胞的稳定表达 OLFM1 与细胞 Sub-G<sub>1</sub> 期存在明显相关,这可能表明 OLFM1 的稳定表达能抑制细胞的生长,阻碍细胞进入正常的细胞周期<sup>[13]</sup>。此外还有研究认为 OLFM1 基因表达受胶质细胞源性神经营养因子 (GDNF) 家族信号转导通路调节,参与 DNA 损伤修复,在神经系统损伤修复中具有重要作用<sup>[14]</sup>。

而本研究应用半定量 RT-PCR、荧光定量 PCR 检测了 OLFM1 基因相对于正常肺组织,在两大主要的肺癌组织类型中的相对表达变化及其相对表达倍数,发现 OLFM1 基因在肺鳞癌原发灶中及其配对正常组织中的表达显著下调。OLFM1 的低表达是肺鳞癌中的常见现象,结合前人的研究结果推测,OLFM1 稳定表达可能参与调控正常的细胞周期,介导细胞凋亡,它的低表达可能是肺鳞癌的一个标志。OLFM1 低表达的机制尚不明确,但有研究表明与基因启动子区的甲基化状态无关<sup>[15]</sup>。另外应用免疫组织化学染色观察 OLFM1 蛋白在肺癌细胞和正常肺上皮细胞定位,其蛋白在肺腺癌细胞中表达明显,定位于胞质中,且表达与患者年龄、性别、肿瘤分期、分化程度间均无显著差异,而在肺鳞癌细胞和正常肺上皮细胞都未见其表达。ERBB2(HER-2/new) 的突变在非小细胞肺癌 (NSCLC) 中非常罕见,仅见于腺癌,在东方人种、女性、非吸烟者中有较高的突变率<sup>[16]</sup>。OLFM1 蛋白也仅在肺腺癌中表达明显,这也可能提示不同病理组织类型肺癌的发生可能有不同的发生机制或途径,在临床上也有不同的特点。至于它在其他系统腺癌组织是否也表达,它的表达与肿瘤的恶性程度及预后是否有关尚有待更深一步研究。

## [参考文献]

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun M J. Cancer statistics, 2009[J]. *CA Cancer J Clin*, 2009, 59: 225-249.
- [2] 赵晋丰, 吴玲玲, 常文军, 黄盛东, 余永伟, 赵立军, 等. 肺癌噬菌体展示肽库的构建及肺癌早期检测分子标志的筛选[J]. *第二军医大学学报*, 2008, 29: 1157-1161.  
Zhao J F, Wu L L, Chang W J, Huang S J, Yu Y W, Zhao L J, et al. Screening for molecular markers for early diagnosis of lung cancer by bacteriophage display[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2008, 29: 1157-1161.
- [3] Laterza O F, Modur V R, Crimmins D L, Olander J V, Landt Y, Lee J M, et al. Identification of novel brain biomarkers[J]. *Clin Chem*, 2006, 52: 1713-1721.
- [4] Barembaum M, Moreno T A, LaBonne C, Sechrist J, Bronner-Fraser M. Noelin-1 is a secreted glycoprotein involved in generation of the neural crest[J]. *Nat Cell Biol*, 2000, 2: 219-225.
- [5] Rich J N, Hans C, Jones B, Iversen E S, McLendon R E, Rasheed B K, et al. Gene expression profiling and genetic markers in glioblastoma survival[J]. *Cancer Res*, 2005, 65: 4051-4058.
- [6] Evans C O, Moreno C S, Zhan X, McCabe M T, Vertino P M, Desiderio D M, et al. Molecular pathogenesis of human prolactinomas identified by gene expression profiling, RT-qPCR, and proteomic analyses[J]. *Pituitary*, 2008, 11: 231-245.
- [7] Allander S V, Illei P B, Chen Y, Antonescu C R, Bittner M, Ladanyi M, et al. Expression profiling of synovial sarcoma by cDNA microarrays[J]. *Am J Pathol*, 2002, 161: 1587-1595.
- [8] Wong Y F, Cheung T H, Lo K W, Yim S F, Siu N S, Chan S C, et al. Identification of molecular markers and signaling pathway in endometrial cancer in Hong Kong Chinese women by genome-wide gene expression profiling[J]. *Oncogene*, 2007, 26: 1971-1982.
- [9] Borczuk A C, Kim H K, Yegen H A, Friedman R A, Powell C A. Lung adenocarcinoma global profiling identifies type II TGF- receptor as a repressor of invasiveness[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005, 172: 729-737.
- [10] 曾 谊, 梁 杰, 沈洪兵. 南京市 1996-2005 年 1128 例肺癌住院病例发病特征的动态变化分析[J]. *中国肺癌杂志*, 2008, 11: 406-409.
- [11] Metayer C, Wang Z, Kleinerman R A, Wang L, Brenner A V, Cui H, et al. Cooking oil fume and risk of lung cancer in women in rural Gansu, China[J]. *Lung Cancer*, 2002, 35: 111-117.
- [12] Wang L, Gao X, Gao P, Deng W, Yu P, Ma J, et al. Cell-based screening and validation of human novel gene associated with cell viability[J]. *J Biomol Screen*, 2006, 11: 369-376.
- [13] Lee J, Oh J, Choi E, Park I, Han C, Kim D H, et al. Differentially expressed genes implicated in unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39: 2265-2277.
- [14] Ngan E S, Shum C K, Poon H C, Sham M H, Garcia-Barcelo M M, Lui V C, et al. Prokineticin-1 (Prok-1) works coordinately with glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) to mediate proliferation and differentiation of enteric neural crest cells[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1783: 467-478.
- [15] Bulgarelli A, Seixas A Q A, Caballero O L, Vettore A L. Hypermethylation status of NRG1 and OLFM1 promoter regions in glioblastomas cell lines[J]. *Appl Cancer Res*, 2005, 25: 181-189.
- [16] Shigematsu H, Takahashi T, Nomura M, Majmuder K, Suzuki M, Lee H, et al. Somatic mutations of the HER2 kinase domain in lung adenocarcinomas[J]. *Cancer Res*, 2005, 65: 1642-1646.