

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.00549

• 技术方法 •

大肠癌噬菌体展示肽库的构建及大肠癌早期检测分子的筛选

吴玲玲^{1△}, 曹付傲^{2△}, 常文军¹, 傅传刚^{2*}, 曹广文^{1*}

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肛肠外科, 上海 200433

[摘要] **目的** 构建大肠癌噬菌体展示肽库, 筛选用于大肠癌早期检测的分子标志。**方法** 选取 30 例第二军医大学长海医院肛肠外科手术后立即冻存的大肠癌组织标本构建 T7 噬菌体展示肽库; 用结合 protein-A/G 的琼脂糖珠分别富集大肠癌组及非肿瘤对照组血清中的抗体进行 5 轮亲和筛选, 富集大肠癌相关肽; 随机挑取 5 轮筛选后的 2 000 个噬菌体克隆, 用 ELISA 方法进一步筛选与大肠癌患者血清和对照血清反应性存在差异的大肠癌相关标志物克隆, 进行基因序列测定。应用通过 Chilibot 文献挖掘方法预测各克隆的蛋白功能, 反证筛选结果。**结果** (1) 所建大肠癌噬菌体展示肽库的滴度为 3.0×10^6 pfu, 经 PCR 鉴定其重组率为 60%, 库容为 1.8×10^6 pfu。(2) 共筛选出 18 个有意义的噬菌体, 测序后, 预测其蛋白功能, 其中 12 个与肿瘤的发生相关。**结论** 应用 ELISA 对肿瘤重组抗原的噬菌体展示肽库进行筛选的方法, 可以用来发现差异表达的抗原。所筛选出的噬菌体克隆所表达的抗原可用于早期筛检大肠癌。

[关键词] 肽库; 结直肠肿瘤; 生物学肿瘤标志

[中图分类号] R 735.34 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)05-0549-04

Screening of molecular markers for early diagnosis of colorectal cancer by phage-peptide library

WU Ling-ling^{1△}, CAO Fu-ao^{2△}, CHANG Wen-jun¹, FU Chuan-gang^{2*}, CAO Guang-wen^{1*}

1. Department of Epidemiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China
2. Department of Anus & Intestine Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To establish a colorectal cancer phage-peptide library and to screen for biomarkers for early detection of colorectal cancer. **Methods** A T7 phage display peptide library was constructed using 30 surgical colorectal cancer specimens from Changhai Hospital, Second Military Medical University. Protein-A/G was used to enrich IgG from control sera as well as colorectal cancer sera. Five biopanning protocols were carried out for enrichment of colorectal cancer-specific phage clones, and 2 000 phage clones were randomly selected. ELISA was used for further screening of clones of different reactivities between the cancer serum and control serum; and the selected clones were subjected to DNA sequencing and the cloned protein function was forecasted by Chilibot for validation. **Results** (1) The titer of the colorectal cancer phage display peptide library was 3.0×10^6 pfu, with a recombination rate of 60% as showed by PCR identification and a storage capacity of 1.8×10^6 pfu. (2) Of the 18 phage clones selected by ELISA, 12 were cancer-related genes. **Conclusion** ELISA for screening the recombinant tumor antigen phage display peptide library can be used to discover new differentially expressed antigens; and the selected phage clones expressing antigen might be used for early detection of colorectal cancer.

[Key words] peptide library; colorectal neoplasms; biological tumor markers

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(5):549-552]

大肠癌(colorectal cancer)是常见的恶性肿瘤之一, 2004至2005年的发病率占全部恶性肿瘤的第3位, 病死率为癌症致死的第5位^[1]。大肠癌的发病率有逐年上升的趋势, 正成为威胁我国人民身体健康的主要疾病之一^[2]。手术治疗是大肠癌目前的主要治疗手段, 同时辅以化疗及生物靶向治疗。早期诊断和及早手术是降低大肠癌病死率^[3]、提高患

者5年生存率^[4]的关键。目前我国常用的早期筛查及诊断大肠癌的方法, 其效果尚不尽人意; 粪便隐血试验简单易行, 但敏感度及特异度都较差; 结肠镜检查是确诊大肠癌的主要检查手段, 但有一定的痛苦, 患者依从性不高; 影像学检查(CT、MRI、PET/CT等)花费较多, 有一定的放射性损伤, 如CT及PET/CT, 且对微小病变识别能力有限, 早期诊断率较

[收稿日期] 2009-10-13 **[接受日期]** 2010-03-11

[基金项目] 上海市科技攻关项目(07dz19505)。Supported by Scientific and Technological Project of Shanghai Municipal Government (07dz19505)。

[作者简介] 吴玲玲, 硕士生。E-mail: spirit50@sohu.com; 曹付傲, 硕士生。E-mail: caofuao@gmail.com

△ 共同第一作者(Co-first authors)。

* 通讯作者(Corresponding authors)。Tel: 021-81873343, E-mail: fugang416@126.com; Tel: 021-81871060, E-mail: gcao@smmu.edu.cn

差。这些方法均不适于社区人群的早期筛查。因此,研究大肠癌的早期筛查方法,尽早诊断大肠癌,对于提高大肠癌患者生存率至关重要。

重组 cDNA 表达文库的血清学分析 (serological analysis of recombinant cDNA expression libraries, SEREX) 是利用血清中的自身抗体对肿瘤 cDNA 文库进行血清学筛选,获得肿瘤特异性或相关抗原的方法。应用噬菌体展示肽库技术对前列腺癌^[5]、乳腺癌^[6] 特异抗原的 SEREX 筛选研究已有报道,且筛选效果达到 80%~90% 的敏感度和特异度。本研究采用 T7 噬菌体展示系统构建大肠癌 cDNA 表达文库,应用 SEREX 方法对文库中的抗原进行筛选,寻找大肠癌早期检测分子标志群,以期在社区人群及高危人群的大肠癌早期筛查寻找突破口。

1 材料和方法

1.1 一般资料 选取第二军医大学长海医院肛肠外科 2008 年 10~12 月手术切除的大肠癌组织标本 30 例,其中男 15 例,女 15 例,年龄 35~79 岁,平均(59.3±12.8)岁,均为腺癌,结肠癌 11 例,直肠癌 19 例。从收集的大肠癌患者血样 300 例及 100 例非癌患者对照血样中挑选大肠癌早期患者的血清 20 例,其中男 10 例,女 10 例,年龄 40~70 岁,平均(56.7±10.0)岁,均为腺癌,结肠癌 7 例,直肠癌 13 例。同时挑选与患者年龄、性别匹配的对照血清 20 例。离体新鲜组织标本液氮冷冻后存于-80℃冰箱。大肠癌患者血样来自新诊断的大肠癌患者,对照组血样来自证实未患有任何类型的癌症及自身免疫性疾病的肛瘘、肠炎等患者。均于手术前取得,置于干燥管中,室温放置至血细胞收缩与血清分离,收集血清备用。

1.2 主要试剂 TRIzol 试剂和 HRP 偶联的山羊抗人 IgG 购自 Promega 公司;肽库构建所用 T7 Select OrientExpress cDNA Cloning Systems 和 T7 Tail Fiber 单克隆抗体购自 Novagen 公司;protein A/G 的琼脂糖珠购自 Calbiochem 公司;rTaqDNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自美国 Axygen 公司;载体 pMD18-T 和 DH5α 感受态细胞购自北京天根生化科技有限公司,引物由上海生物工程技术有限公司合成。

1.3 大肠癌组织噬菌体展示肽库的构建 各组织标本的总 RNA 抽提按 TRIzol 试剂盒说明书操作完成。经 UV7504 紫外分光光度计对提取的总 RNA 进行纯度鉴定和定量,并经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳证实其完整性。将 30 例大肠癌组织的总 RNA 等量混合后,用 mRNA 提取试剂盒,利用结合 poly(A) 的磁珠提取 mRNA,并经过紫外分光光度计定量和 1.5% 琼脂糖凝胶电泳证实其完整性。mRNA 用 T7 Select OrientExpress cDNA Cloning Systems 所包含的 5 个试剂盒经反转录、末端平齐、加接头、Hind III/EcoR I 双酶切、定向克隆入载体 T7 噬菌体的双臂,克隆位点为壳蛋白 103B,再进行体外包装,成功构建成大肠癌噬菌体展示肽库。为同时扩增 N 端和 C 端的氨基酸,分别使用了随机引物和 Oligo(T)15 作为反转录的引物。将肽库液取 2 ml 分装成管,加入 0.2 体积的 80% 甘油分别保存于-80℃和 4℃冰箱。

1.4 展示肽库的扩增 取 20 ml 加羧苄青霉素的 LB 于消毒玻璃瓶中,用接种环挑取一个新划线 LB 平板上的 BLT5403 单克隆菌落,于 37℃、5.4×g 振荡 4~6 h,使菌液的光密度 D_{600} 值达 0.6~1.0。取 100 μl 的噬菌体肽库液、新摇好的菌液 5 ml 和预热并保温在 55℃ 的顶层琼脂 5 ml 于 15 ml 消毒管中,快速混匀并倾倒入已预热到 37℃ LB 平板中,铺平,待冷却后翻转置于 37℃ 温箱孵育 4 h 或室温过夜。加入 10 ml 的洗脱液,4℃ 放置 2 h 以上,吸取上层的液体于 15 ml 消毒管中,加入 0.5 ml 的氯仿颠倒混匀后 1 060×g 离心 5 min。吸取上清于两新管中,加入 80% 的甘油,扩增的噬菌体分别保存于-80℃和 4℃。

1.5 亲和筛选 为富集与大肠癌自身抗体结合的特异展示肽,对展示肽库进行了正反向的 5 轮亲和筛选。首先将血清中的抗体结合到琼脂糖珠,对抗体进行富集。取 10 μl protein A/G 的琼脂糖珠于 1.5 ml Eppendorff 管中,pH 7.4 的 PBS 洗 3 次,1% BSA/PBS 4℃ 封闭 1 h。琼脂糖珠分别与 20 例 15 μl 大肠癌患者及 20 例对照患者的血清 4℃ 孵育过夜。PBS 洗涤 3 次后,用 10 μl 的 PBS 悬浮琼脂糖珠。20 管大肠癌的抗体及 20 管对照的抗体各自合并成一管。其次,应用结合抗体的琼脂糖珠对肽库进行亲和筛选。取噬菌体库扩增液 20 μl,先与 20 μl 的对照抗体琼脂糖珠孵育 1 h,未结合的上清再与 20 μl 大肠癌抗体琼脂糖珠结合,保留结合到琼脂糖珠上的噬菌体,并将其 100 μl 1% SDS 洗脱。再对洗脱下来的噬菌体进行扩增,进入下一轮亲和筛选。在每一轮筛选后分别测定肽库中噬菌体的滴度,如此反复 5 轮。

1.6 大肠癌特异标志物的筛选 随机挑取了 5 轮筛选后的 2 000 个噬菌体克隆,对这 2 000 个噬菌体克隆进行了 PCR 产物检测以排除无插入片段的空噬菌体。应用 T7 载体两臂的序列设计引物,进行 PCR 扩增。上游引物:5'-GGA GCT GTC GTA TTC CAG TC - 3',下游引物:5'-AAC CCC TCA AGA CCC GTT TA - 3'。扩增条件:80℃ 5 min;94℃ 50 s,50℃ 1 min,72℃ 1 min,35 个循环;72℃ 6 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳 120 V 电泳 25 min。溴化乙啶染色,UV 灯下观察扩增产物的长度。空噬菌体的扩增片段为 90 bp,>100 bp 则认为是有插入片段的重组噬菌体。对有插入片段的噬菌体用 ELISA 方法进行下一步的筛选。将大肠癌早期患者的血清 20 例等量混合成一管,将对照血清 20 例等量混合成另一管。

每孔加入 100 μl 按 1:1 000 稀释的 T7 Tail Fiber 单克隆抗体(Novagen),4℃ 过夜使抗体包被于酶标孔中,清水洗涤 5 次后,200 μl 2% BSA/PBS 室温封闭 2 h,加入 1:5 稀释的噬菌体样本 100 μl 室温孵育 2 h。洗涤后每个噬菌体标本加入 1:500 稀释的大肠癌混合血清和对照血清各 100 μl,室温孵育 1 h。洗涤后加入 1:10 000 稀释的 HRP 偶联的山羊抗人 IgG 100 μl,室温放置 1 h。洗涤后加入可溶性单组分 TMB 底物溶液 100 μl,37℃ 孵育 20 min,立即加入 1.5 mol/L 的硫酸 25 μl,在酶标仪下 450 nm 波长处读取 D 值。设置 1:1 的复孔,同时每种不同的血清设 2 孔空噬菌体作为阴性对照(其他条件完全一样),并设 2 孔空白对照(除不加血清外,其他条件完全一样)。为质量控制,所设复孔之间的 D 值不得超过 0.01,超

过 0.01 则应重复试验。按下列公式计算并判断结果: 计算复孔 D 值的平均值, 用空白孔调零后, 以其各自阴性对照的 2 倍作为判断标准(若减去空白后阴性对照 D 值低于 0.05 则按 0.05 计算, 高于 0.05 则按实际 D 值计算)。样本 D 值大于判断标准则为阳性, 反之则为阴性。挑选与大肠癌混合血清反应为阳性, 而与对照混合血清反应为阴性的噬菌体克隆。这些与大肠癌患者血清反应性高而与对照血清反应性低的噬菌体, 即为有意义且具有诊断大肠癌潜能的噬菌体样本。

1.7 序列测定和基因功能预测 ELISA 筛选出的噬菌体克隆, 其插入片段经 PCR 后, 将 PCR 产物经回收后克隆入 pMD18-T 载体进行测序。将得到的序列经过 NCBI 上的 BLAST 序列比对, 找到完全一致或者最接近的已知基因序列。将已知基因名和肿瘤、凋亡、转移作为关键词, 通过 Chilibot(<http://www.chilibot.net/>) 搜索既往文献, 判断这些基因是否与肿瘤相关。

在后基因组时代, 功能基因组学的研究表明, 基因通过组成功能模块的方式行使功能^[7], 而且近邻相互作用的蛋白质具有相似的功能^[8]。应用 VisANT 网上数据库(<http://visant.bu.edu/>) 作为工具研究基因相互作用, 研究这些已知基因都与哪些基因之间存在相互联系, 即寻找其伙伴基因, 通过研究伙伴基因的功能, 反证这些已知基因的功能。

2 结果

2.1 肽库基本情况 所建的大肠癌噬菌体原始展示肽库的滴度为 3.0×10^6 pfu, 噬菌体生长情况见图 1, 可见在 LB 平板上所生长的大肠杆菌形成一层薄膜, 而在薄膜上分布着边

缘清晰的圆形空斑, 单个空斑可以认为是由单个噬菌体增殖产生的。随机挑选 20 个噬菌体 PCR 扩增插入片段, 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定其中 12 个为重组噬菌体, 重组率为 60%, 根据重组率计算该库的库容为 1.8×10^6 pfu。扩增原始肽库后, 对肽库进行 5 轮亲和筛选, 5 轮筛选后随机挑选 2 000 个噬菌体, 排除 743 个扩增片段为 90 bp 的空噬菌体, 对 1 247 个重组噬菌体进行后续的 ELISA 筛选。

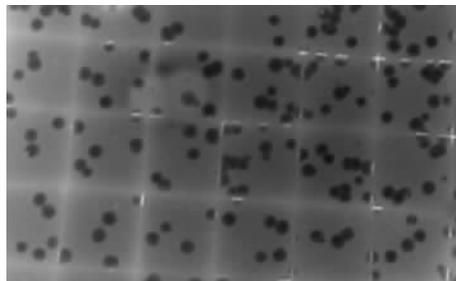


图 1 噬菌斑的形成

Fig 1 The formation of phages

2.2 ELISA 筛选结果 以空白孔调零后, 以其各自阴性对照的 2 倍作为判断标准, 与大肠癌混合血清反应为阳性, 且与对照混合血清反应为阴性的噬菌体共 18 个噬菌体克隆。这些噬菌体克隆所展示的抗原与大肠癌患者血清中的自身抗体反应性高、而与对照血清反应性低, 这可能说明噬菌体克隆所展示的抗原在大肠癌组织中特异表达, 从而刺激机体产生自身抗体, 它们可能具有诊断大肠癌潜能。ELISA 反应结果见表 1。

表 1 经 ELISA 筛选出来 18 个噬菌体克隆的反应结果及特征

Tab 1 Results and characteristics of 18 phages screened by ELISA

Phage	D value			Insert size (bp)	Location in human chromosomes	Blast gene	Related to cancer
	CRC	Control	Criterion				
1	0.171	0.092	0.14	302	7p15.3	CYCS	Yes
2	0.142	0.082	0.14	297	4q24	UBE2D3	Yes
3	0.141	0.085	0.14	230		Novel	Unknown
4	0.15	0.085	0.14	247	1q32	SNRPE	Yes
5	0.282	0.121	0.272	278	19q13.1	COX6B1	Unknown
6	0.235	0.128	0.272	396	9q31	TXN	Yes
7	0.229	0.172	0.21	219	7p11.2	CHCHD2	Yes
8	0.281	0.215	0.272	305	16p13.1	NT_010393.16	Unknown
9	0.189	0.058	0.172	283	14q32.33	IGHG3	Yes
10	0.212	0.169	0.21	480	1p36.3	XM_002342023.1	Unknown
11	0.289	0.157	0.21	304	2p11.3	IGKC	Yes
12	0.19	0.149	0.163	611	1p36-p34.1	UBIAD1	Yes
13	0.169	0.112	0.123	517	19p13.2	NDUFA13	Yes
14	0.141	0.116	0.127	210	3q12	RPL24	Yes
15	0.146	0.127	0.127	391	16q23.3	HSDL1	Yes
16	0.14	0.095	0.127	280		Novel	Unknown
17	0.166	0.129	0.127	230		Novel	Unknown
18	0.154	0.107	0.107	294	19p13.3	EEF2	Yes

CRC: Colorectal cancer

2.3 基因相互作用预测结果 通 NCBI 上的 BLAST 序列比对, 查找插入片段最接近的已知基因序列, 其中共比对上 14 个已知基因和 1 个基因组序列, 尚有 3 个序列未比对上任何序列。通过 Chilibot 搜索结果, 发现所比对上的 12 个已知

基因与肿瘤有关(表 1)。在未比对上基因的克隆中, 3 号噬菌体克隆和 19 号噬菌体克隆有相同的一段序列。一般认为恶性肿瘤细胞是因为失控生长, 过度增殖的结果, 从细胞凋亡的角度看则认为是肿瘤的凋亡机制受到抑制不能正常进

行细胞死亡清除的结果。许多癌基因及其表达产物是细胞凋亡的重要调节因子,当它们表达后,阻断或干扰了肿瘤细胞的凋亡过程,使肿瘤细胞不断增殖。目前肿瘤生物治疗的主要研究方向之一就是重建肿瘤细胞的凋亡信号转导系统,诱导肿瘤细胞凋亡。而在我们所筛选出的10个噬菌体中,1号噬菌体编码的细胞周期色素C(CYCS)^[9]、13号噬菌体编码的NDUFA13^[10]和18号噬菌体编码的真核生物翻译延伸因子(EEF2)^[11]与诱导细胞凋亡有关,对于维持正常细胞的活动和功能有重要意义。而6号噬菌体所编码的硫氧化还原蛋白(TXN)参与信号转导通路,在肿瘤中出现失调^[12-13];12号噬菌体编码UBIAD1蛋白,参与细胞周期调节^[14]。而还有部分克隆在其他的肿瘤细胞文库中也被筛选到,如14号噬菌体编码的核糖体蛋白24(RPL24)在肝细胞癌文库中也被筛选出,它可引起特异性体液免疫反应^[15];15号噬菌体编码的HSDL1在前列腺癌中高表达,可能与前列腺癌的发生有关^[16]。

3 讨论

我们利用噬菌体展示肽库技术构建了大肠癌重组cDNA噬菌体展示肽库。理论上,噬菌体展示的肽段越长,其肽库多样性即库容量就越高,筛选的成功率就越大。而我们所建的肽库库容为 1.8×10^6 pfu,重组率为60%,重组子中约50%的插入片段长度为300~500 bp,而且有超过800 bp大小的插入片段,从随机肽的长度上来评价的话,可以用来后面的筛选。在本次ELISA实验中所筛选出的噬菌体,根据我们的筛选标准,其表面所表达抗原与患者血清中抗体结合强度高于阴性质控的2倍,而与对照血清抗体的结合强度与阴性质控相差不明显(小于2倍)。通过这样的筛选,排除了与患者血清中抗体和对照血清中抗体结合强度无差别或差别不大的噬菌体克隆,以期筛选出在大肠癌患者中高表达的抗原。而这些筛选出的克隆,序列多约300 bp,这可能与我们所选用的噬菌体展示系统有关,这个现象在其他文献中也有报道^[5]。对它们进行序列比对、查找参考基因,再应用生物信息学对基因功能和相互作用进行分析,结果说明筛选出的噬菌体含有丰富的信息,如CYCS^[17-18]、HSDL1^[16]和EEF2^[19-20]等基因在既往的研究中与肿瘤的发生密切相关,说明这个筛选方法用来挖掘肿瘤相关基因或抗原合理可靠。这从生物信息学分析的角度反证了我们前面所筛选出来的噬菌体与肿瘤的发生和发展关系密切,这些噬菌体克隆可以帮助我们找到大肠癌相对于正常组织差异表达的抗原,从而实现早期筛选。但是由于我们筛选所用的血清为两组人群的混合血清,由于个体的差异,筛选出的噬菌体与单个患者血清反应的整体性如何,能否应用到临床检验中,都需要大量的血样本反应来验证。但值得肯定的是,这种借助噬菌体展示肽库技术的ELISA筛选方法,是可以用来发现差异表达抗原。另外,还有一些未比对上参考序列的噬菌体,这些噬菌体能够被筛选出来,它所带的信息以及如何挖掘尚需要我们更多的探索。

【参考文献】

[1] 中华人民共和国卫生部. 2009年中国卫生统计摘要[EB/OL].

http://www.moh.gov.cn/public_files/business/html_files/mohbgt/s8274/200905/40765.htm[(2009-05-20)].

- [2] 李明,顾晋. 中国结直肠癌20年来发病模式的变化趋势[J]. 中华胃肠外科杂志,2004,7:214-217.
- [3] Parkin D M, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 1999, 49: 33-64.
- [4] 傅传刚,赵威. 直肠癌术前影像学诊断的作用和意义[J]. 临床外科杂志,2005,13:680-682.
- [5] Wang X, Yu J, Sreekumar A, Varambally S, Shen R, Giacherio D, et al. Autoantibody signatures in prostate cancer [J]. New Engl J Med, 2005, 353: 1224-1235.
- [6] Fernández-Madrid F, Tang N, Alansari H, Granda J L, Tait L, Amirikia K C, et al. Autoantibodies to annexin XI-A and other autoantigens in the diagnosis of breast cancer[J]. Cancer Res, 2004, 64: 5089-5096.
- [7] Hartwell L H, Hopfield J J, Leibler S, Murray A W. From molecular to modular cell biology[J]. Nature, 1999, 402(6761 Suppl): C42-C52.
- [8] Rivers A W, Galitski T. Modular organization of cellular networks[J]. Proc Natl Acad Sci, 2003, 100: 1128-1133.
- [9] Honarpour N, Gilbert S L, Lahn B T, Wang X, Herz J. Apaf-1 deficiency and neural tube closure defects are found in fog mice [J]. Proc Natl Acad Sci, 2001, 98: 9683-9687.
- [10] Zhang X, Huang Q, Yang Z, Li Y, Li C Y. GW112, a novel anti-apoptotic protein that promotes tumor growth[J]. Cancer Res, 2004, 64: 2474-2481.
- [11] Wüllner U, Neef I, Eller A, Kleines M, Tur M K, Barth S. Cell-specific induction of apoptosis by rationally designed bivalent aptamer-siRNA transcripts silencing eukaryotic elongation factor 2[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2008, 8: 554-565.
- [12] Cha M K, Suh K H, Kim I H. Overexpression of peroxiredoxin I and thioredoxin 1 in human breast carcinoma[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2009, 30: 28, 93.
- [13] Fernandes A P, Capitanio A, Selenius M, Brodin O, Rundlöf AK, Björnstedt M. Expression profiles of thioredoxin family proteins in human lung cancer tissue: correlation with proliferation and differentiation[J]. Histopathology, 2009, 55: 313-320.
- [14] McGarvey T W, Nguyen T, Puthiyaveetil R, Tomaszewski J E, Malkowicz S B. TERE1, a novel gene affecting growth regulation in prostate carcinoma[J]. Prostate, 2003, 54: 144-155.
- [15] Uemura M, Nouse K, Kobayashi Y, Tanaka H, Nakamura S, Higashi T, et al. Identification of the antigens predominantly reacted with serum from patients with hepatocellular carcinoma [J]. Cancer, 2003, 97: 2474-2479.
- [16] Huang Y, Tang R, Dai J, Gu S, Zhao W, Cheng C, et al. A novel human hydroxysteroid dehydrogenase like 1 gene (HSDL1) is highly expressed in reproductive tissues [J]. Mol Biol Rep, 2001, 28: 185-191.
- [17] Bredel M, Scholtens D M, Harsh G R, Bredel C, Chandler J P, Renfrow J J, et al. A network model of a cooperative genetic landscape in brain tumors[J]. JAMA, 2009, 302: 261-275.
- [18] Valta M P, Tuomela J, Vuorikoski H, Lopenen N, Väänänen R M, Pettersson K, et al. FGF-8b induces growth and rich vascularization in an orthotopic PC-3 model of prostate cancer[J]. J Cell Biochem, 2009, 107: 769-784.
- [19] Nakamura J, Aoyagi S, Nanchi I, Nakatsuka S, Hirata E, Shibata S, et al. Overexpression of eukaryotic elongation factor eEF2 in gastrointestinal cancers and its involvement in G₂/M progression in the cell cycle[J]. Int J Oncol, 2009, 34: 1181-1189.
- [20] Li L, Chen S H, Yu C H, Li Y M, Wang S Q. Identification of hepatocellular-carcinoma-associated antigens and autoantibodies by serological proteome analysis combined with protein microarray[J]. J Proteome Res, 2008, 7: 611-620.

【本文编辑】尹茶