

LST-R1 细胞差异表达蛋白的初步筛选和鉴定

童华生¹, 赖晓嵘², 张亚历³, 姜泊³, 苏磊¹

Screening and Identifying Differentially Expressed Proteins in LST-R1 Cells

TONG Hua-Sheng¹, LAI Xiao-Rong², ZHANG Ya-Li³, JIANG Bo³, SU Lei¹

1. 广州军区广州总医院

ICU科,

广东 广州 510010

2. 广东省人民医院

消化内科,

广东 广州 510080

3. 南方医科大学南方医院

消化病研究所,

广东 广州 510515

*1 Intensive Care Unit,**General Hospital of**Guangzhou Military Command,**Guangzhou, Guangdong, 510010,**P. R. China**2 Department of Gastroenterology,**Guangdong Provincial People's**Hospital,**Guangzhou, Guangdong, 510080,**P. R. China**3. Institute for Digestive Diseases,**Nanfang Hospital,**Nanfang Medical University,**Guangzhou, Guangdong, 510515,**P. R. China*

通讯作者: 姜泊

Correspondence to: JIANG Bo

Tel: 86-20-61641541

Fax: 86-20-61641541

E-mail: drjiang@163.com

收稿日期: 2008-03-19

修回日期: 2008-07-13

[ABSTRACT] **BACKGROUND & OBJECTIVE:** Colorectal laterally spreading tumor (CLST) rarely invades deeply but always laterally spreads along the colorectal mucosa, therefore, CLST could be used as a comparative model in studying the invasion and metastasis of colorectal cancer (CRC). This study was to identify differentially expressed proteins between a CLST cell line LST-R1 and two colorectal carcinoma cell lines SW480 and LoVo using proteomic technology. **METHODS:** Total proteins of LST-R1, SW480 and LoVo cells were isolated by two-dimensional electrophoresis (2-DE). Differentially expressed protein spots were analyzed with Melanie 3 software. The peptide mass fingerprints (PMFs) of differentially expressed proteins were analyzed by MALDI-TOF mass spectrum. Subsequently matched proteins were searched through protein databases. **RESULTS:** Using pH4-7 IPG gels with 250 μ g protein loading, the numbers of protein spots in 2-DE maps were 1285 \pm 51 in LST-R1 cells, 1184 \pm 47 in SW480 cells, and 1124 \pm 54 in LoVo cells; when with 150 μ g protein loading, the numbers were 989, 935 and 893, respectively. The distribution and levels of these proteins in 2-DE maps of LST-R1, SW480 and LoVo cells were analogical which indicated CLST also expresses the protein profile of common colorectal tumors. In 2-DE maps, 96 \pm 7 differential protein spots were detected between LST-R1 cells and SW480 cells with 50 \pm 6 only expressed or obviously over-expressed in LST-R1 cells and 47 \pm 5 in SW480 cells; 108 \pm 10 differential protein spots were detected between LST-R1 cells and LoVo cells with 56 \pm 8 only expressed or obviously over-expressed in LST-R1 cells and 52 \pm 11 in LoVo cells. Nineteen differentially expressed proteins were identified among LST-R1, SW480 and LoVo cells. **CONCLUSION:** Nineteen differentially expressed proteins are possibly involved in laterally spreading of CLST and adhesion and invasion of CRC.

KEYWORDS: Colorectal neoplasm; Laterally spreading neoplasm; LST-R1 cell; Proteome; Differential expression

【摘要】背景与目的: 大肠侧向发育型肿瘤(colorectal laterally spreading tumor, CLST)生长方式为沿大肠粘膜浅表侧向扩散而少向肠壁深层侵袭, 该特点与普通大肠癌的易深层侵袭高转移的特性迥异, 因此CLST可作为大肠癌侵袭转移研究的对照病变模型。本研究应用蛋白质组学方法分析和鉴定CLST细胞株LST-R1和结肠肿瘤SW480细胞株及LoVo细胞株差异表达蛋白。方法: 以2-DE分离三种细胞株总蛋白质, 银染显色, 进行差异蛋白质分析。采用MOLDI-TOF质谱对40个差异蛋白质斑点进行肽质谱指纹图(peptides mass fingerprinting, PMF)分析, 最后在蛋白质数据库中搜索匹配的蛋白质。结果: 使用pH4~7 IPG胶条测得2-DE图谱蛋白质斑点数分别为1285 \pm 51、1184 \pm 47和1124 \pm 54; 蛋白质上样量为150 μ g时分别获得989、935和893个蛋白质斑点。综合分析LST-R1、SW480和LoVo细胞株2-DE图谱, 多数蛋白质斑点的分布和表达量相似, 这表明CLST也表达一般大肠肿瘤所具有的蛋白质谱。LST-R1细胞和SW480细胞在pH4~7 IPG胶条2-DE图谱间存在(96 \pm 7)个蛋白质差异点, 其中(50 \pm 6)个点仅在LST-R1细胞株中表达或表达明显增强, (47 \pm 5)个点仅在SW480细胞中表达或表达明显增强; 而在LST-R1

细胞和 LoVo 细胞的 2-DE 图谱间存在(108±10)蛋白质差异点,其中(56±8)个点仅在 LST-R1 细胞株中表达或表达明显增强,(52±11)个点仅在 LoVo 细胞中表达或表达明显增强;三种细胞之间共鉴定出 19 个差异表达蛋白质。结论:筛选出 19 个 CLST 细胞株 LST-R1 相关蛋白质,这些蛋白可能在 CLST 病变浅表扩散形成和大肠癌粘附侵袭过程中发挥一定的作用。

关键词:大肠肿瘤;侧向发育型肿瘤;LST-R1 细胞;蛋白质组;差异表达

中图分类号:R735.3 文献标识码:A

文章编号:1000-467X(2008)12-1277-06

大肠侧向发育型肿瘤(colorectal laterally spreading tumor, CLST)因其特异的生物学特性可能给大肠癌侵袭转移研究带来启示。CLST 形态学表现为沿大肠粘膜浅表侧向扩散而少向肠壁深层侵袭^[1,2],该特点与普通大肠癌易深层侵袭和高转移的特性迥异,因此 CLST 可作为大肠癌侵袭转移研究的对照病变模型。我们已建立了一 CLST 癌细胞株 LST-R1^[3],体外实验已证实其侵袭力相对弱于人大肠癌 SW480 和 LoVo 细胞株,同时利用基因芯片筛选出了一系列三种细胞株差异表达的基因。本实验利用蛋白质组学方法在蛋白质表达谱层面研究 LST-R1 细胞的差异表达蛋白。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料和试剂

LST-R1 细胞株为第一军医大学南方医院消化病研究所建株^[3],其组织来源为一直肠 LST 病变,病理类型为绒毛状腺瘤,伴中重度不典型增生,体外稳定传代为癌细胞株;SW480 细胞株(ATCC 编号:CCL-228)和 LoVo 细胞株(ATCC 编号:CCL-229)购自中国科学院上海细胞生物研究所。

0.25%胰蛋白酶/0.02%EDTA、青霉素、链霉素溶液和 RPMI-1640 基础培养液为 GIBCO 产品,小牛血清购自杭州四季青生物制品研究所。IPG 干胶条 pH3~10 和 pH4~7 与相应的 IEF 缓冲液及三丁基膦(TBP)购自 Bio-Rad 公司,超纯尿素(urea)、硫脲、碘乙酰胺、二硫苏糖醇(DTT)、甘油(glycerol)、亚甲叉双丙烯酰胺(N,N-methylenebisacrylamide)、四甲基乙二胺(TEMED)、矿物油、过硫酸胺(APS)和溴酚蓝均购自 Sigma 公司,丙烯酰胺(acrylamide)和苯甲基磺酰氟(PMSF)购自 BEBCO 公司,三羟甲基胺基甲烷(Tris)购自 Genview 公司,CHAPS 购自 Amresco 公司,其余试剂均为分析纯以上。PROTEAN IEF cell 系统和 Bio-Rad PROTEAN II xi

系统均为 Bio-Rad 公司产品,Voyage-DE STR MALDI-TOF 质谱仪为美国 ABI 公司产品,恒温水浴箱和超声仪为国产仪器。

1.2 实验方法

1.2.1 样品的制备 细胞培养于 10% FCS+RPMI-1640 培养基中,待生长至对数生长期、密度约为 80%时刮下细胞离心收集。按细胞与裂解液体积比为 1:10 加入细胞裂解液(7 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,4% CHAPS,65 mmol/L DTT),同时加入 1 mmol/L PMSF,旋涡振荡,反复液氮快速冻融 4 次,加 DNase I 50 μg/mL 和 RNase A 25 μg/mL 室温作用 15 min,4℃ 15 000 r/min 离心 1 h,收集上清-80℃冻存备用,Bradford 法测定蛋白浓度。

1.2.2 第一向固相 pH 梯度等电聚焦 主要按 Görg 等^[4]方法略有改动,取蛋白质样品,加入重水化液(7 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,2%CHAPS、50 mmol/L DTT)至终体积为 300 μL,临时加入 2 nmol/L TBP 和 0.2% IEF 缓冲液,室温充分溶解。然后移入胶条槽中,胶面朝下放入 17 cm IPG (immobilized pH gradient)干胶条,避免产生气泡,1 h 后覆盖 3 mL 矿物油,20℃重水化 12 h。取出重水化胶条转移至等电聚焦(isoelectric focusing,IEF)聚焦盘槽中,加适量的矿物油后进行 IEF。IEF 条件:250 V 0.5 h → 500 V 1 h → 1 000 V 1 h → 5 000 V 3 h → 10 000 V 70 000 Vh → 500 V 维持,温度为 20℃,最高电流为 50 μA。

1.2.3 胶条平衡 胶条依次在平衡液 I (5 mol/L 尿素,2% SDS,50 mmol/L tris-HCl,20% 甘油,2% DTT)和平衡液 II (5 mol/L 尿素,2% SDS,50 mmol/L Tris-HCl,20%甘油,2.5%碘乙酰胺)各 5 mL 中平衡 10 min。

1.2.4 二向垂直 SDS-PAGE 将平衡后的 IPG 胶条转移至凝胶的上方,胶条一端置低分子量蛋白质标准,0.5%的琼脂糖封闭。电泳参数如下:每条胶 12 mA 0.5 h,然后改为每条胶 24 mA 电泳直至溴酚蓝前沿抵达凝胶底部为止。

1.2.5 银染 银染步骤按以下程序进行:固定→浸泡→漂洗→银染→显色→终止。

1.2.6 图像可视化 通过 PowerLook 1100 扫描仪获取图像,用 Melanine 3 分析软件对图像进行分析。

1.2.7 MALDI-TOF 质谱测定肽质谱指纹图 蛋白质原位酶解,依次进行取点和脱色、还原和烷基化、酶解和萃取。

1.2.8 MALDI-TOF 肽质量指纹图 以 α -氰基-4-羟基肉桂酸作为基质, Voyage-DE STR MALDI-TOF 质谱仪进行肽脂纹谱测定。

1.2.9 蛋白质鉴定数据库搜索 利用 Peptide Search (www.mann.embl-heidelberg.de/services/Peptide)、MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm>)和 MOWSE (www.dl.ac.uk/SEQNET/mowse.htm/)进行蛋白质鉴定。

1.2.10 细胞免疫化学 SP 法检测三种细胞差异蛋白 dUTPase 表达。细胞培养 48 h 后, 4%多聚甲醛室温固定 30 min, 3% H₂O₂ 室温作用 10 min, 0.3% Triton-X100 室温浸泡 10 min, 山羊血清室温封闭 10

min, dUTPase 多克隆抗体 4℃反应过夜, 依次用生物素标记山羊抗银兔二抗和辣根过氧化酶标记的三抗室温作用 10 min, DAB 显色呈棕黄色者为阳性。

2 结果

2.1 2-DE 图谱分析

相同的实验条件和参数设置的情况下, 实验重复三次。蛋白质上样量为 250 μ g, 使用 pH4~7 IPG 胶条测得 LST-R1、SW480 和 LoVo 细胞蛋白质 2-DE 图谱蛋白质斑点数分别为 1285 \pm 51、1184 \pm 47 和 1124 \pm 54(图 1); 蛋白质上样量为 150 μ g 时分别获得 989、935 和 893 个蛋白质斑点(图 1)。

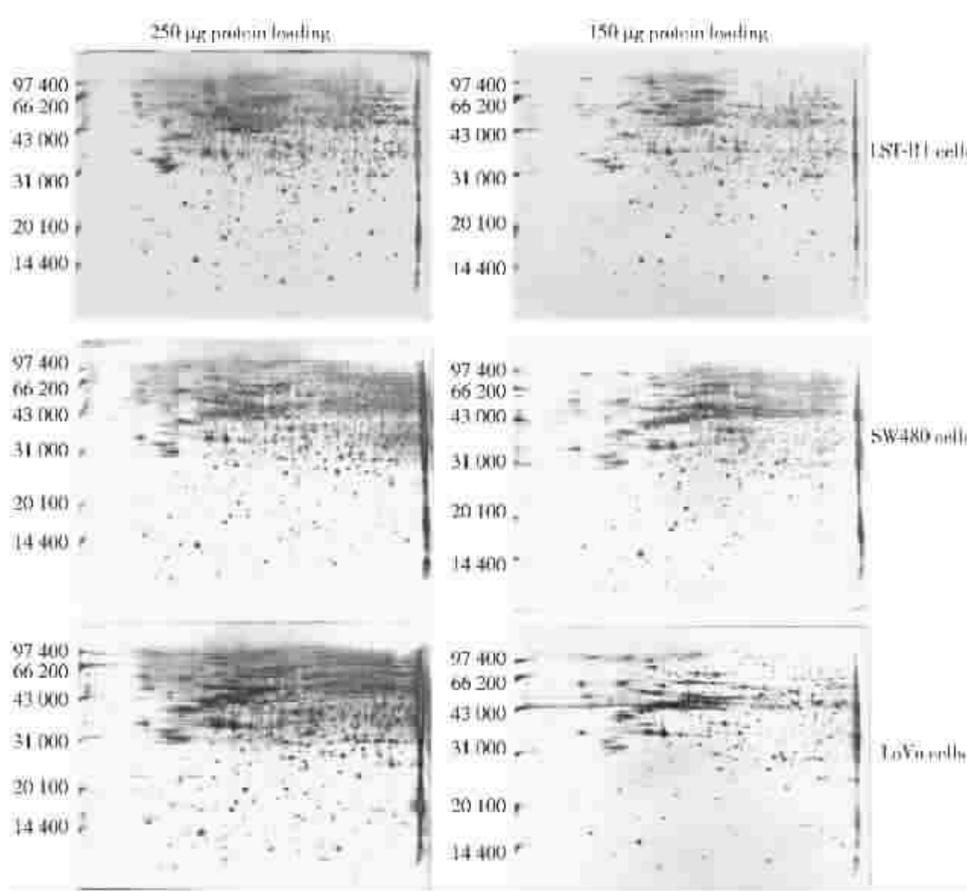


图 1 17 cm pH4~7 IPG 胶条 2-DE 图谱

Figure 1 The 2-DE maps of 17 cm pH4~7 IPG gels

2.2 差异蛋白质斑点分析

综合分析 LST-R1、SW480 和 LoVo 细胞株 2-DE 图谱中多数蛋白质的分布和表达量是相似的, 这表明 CLST 也表达一般大肠肿瘤所具有的蛋白质谱, 提示 CLST 具备一般性大肠肿瘤病变的大部分特性。但是 LST-R1 和 SW480 细胞在 pH4~7 IPG 胶条 2-DE 图谱间存在(96 \pm 7)个蛋白质差异点, 其中(50 \pm 6)个点仅在 LST-R1 细胞株中表达或表达明显

增强, (47 \pm 5)个点仅在 SW480 细胞中表达或表达明显增强; 而在 LST-R1 和 LoVo 细胞 2-DE 图谱间存在(108 \pm 10)个蛋白质差异点, 其中(56 \pm 8)个点仅在 LST-R1 细胞株中表达或表达明显增强, (52 \pm 11)个点仅在 LoVo 细胞中表达或表达明显增强。图 2 为部分差异蛋白质斑点局部放大图。

2.3 肽质量指纹图

MALDI-TOF 质谱测定所获蛋白质 PMFs 后, 选

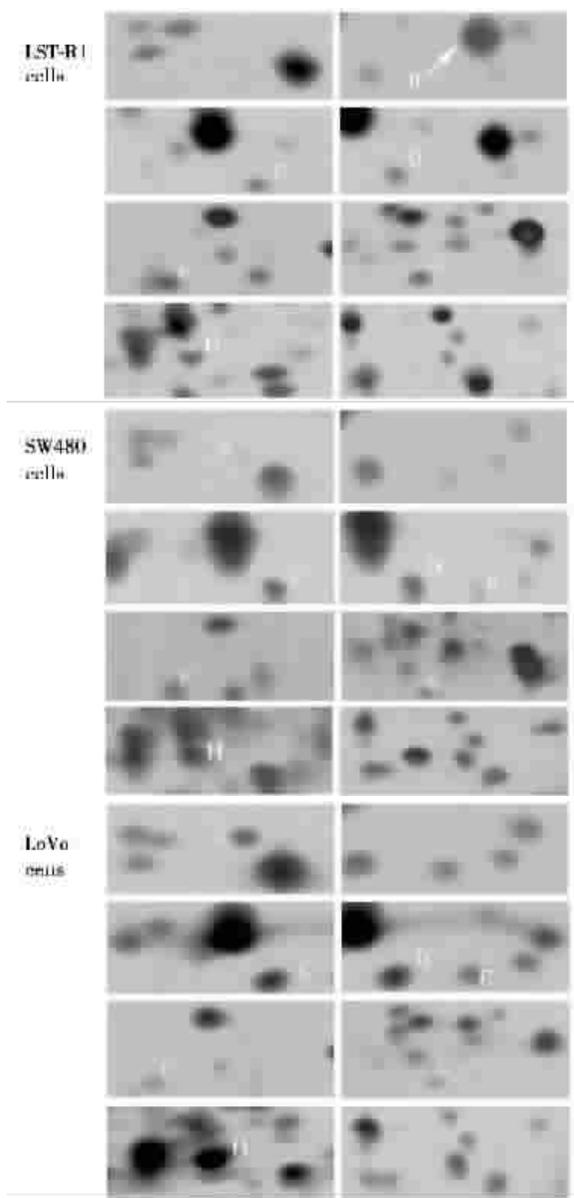


图 2 LST-R1、SW480 和 LoVo 三种细胞中部分差异蛋白质斑点局部放大图

Figure 2 Magnification of the differentially expressed protein spots among LST-R1, SW480, and LoVo cells

The letters indicate differentially expressed protein spots.

取胰蛋白酶任两降解片段进行内部校正,获得更准确 PMFs,图 3 为部分内部校正后蛋白质 PMFs。

2.4 蛋白质搜库鉴定

经将一系列参数进行蛋白质数据搜索,初步鉴定出 19 个差异表达蛋白质,如表 1。其中部分蛋白质如 galectin-1、dUTPase 和 uPAR 与肿瘤转移密切相关。

2.5 细胞免疫化学检测 dUTPase 表达

LST-R1、SW480 和 LoVo 细胞株均表达 dUTPase 蛋白,SW480 和 LoVo 表达部位以胞核为主,但 LST-R1 细胞以胞浆表达为主。3 种细胞中 dUTPase 蛋白表达强度 LoVo>SW480>LST(图 4)。

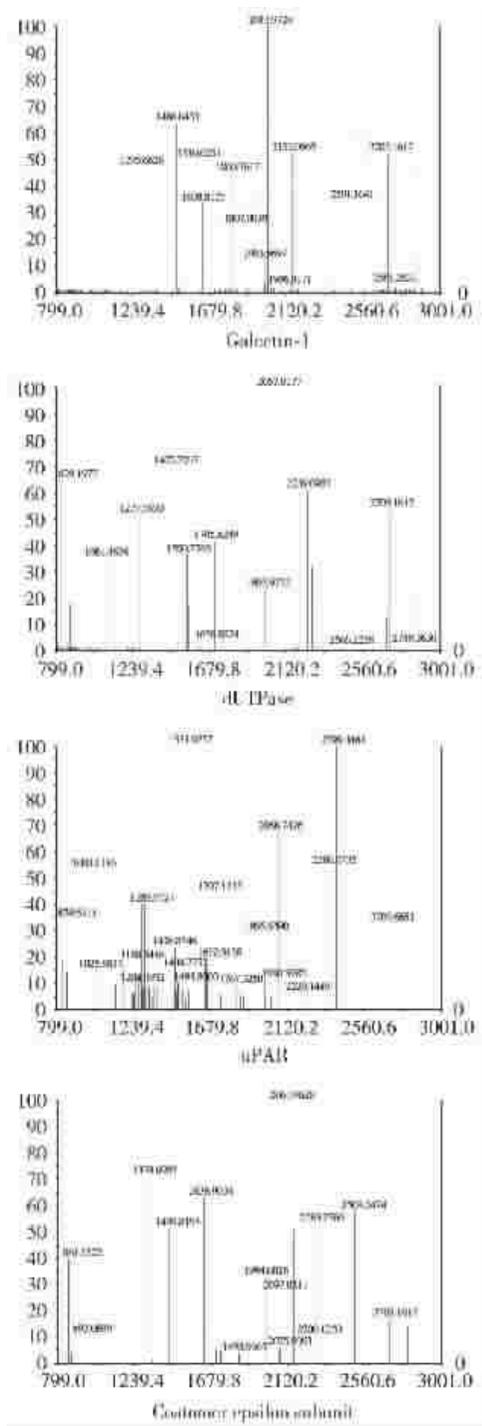


图 3 4 种蛋白质肽质量指纹图谱分析

Figure 3 The peptide mass fingerprints (PMFs) of four proteins

3 讨论

目前 CLST 的研究主要局限于内镜学和临床病理学^[5-9],而对于 CLST 特殊的生物学特性与其细胞分子生物学之间的相关性研究较少,且主要是归类于大肠浅表性病变而非单独对其进行研究^[10-14]。研究发现 CLST 组织中 p53 存在着不同程度的过表达、突变和 K-ras 的突变^[10],但这似乎与 CLST 病

表 1 LST-R1 细胞相对于 LoVo 和 SW480 细胞差异表达蛋白质

Table 1 The differentially expressed proteins among LST-R1, LoVo and SW480 cells

LST-R1>SW480>LoVo	LoVo>SW480>LST-R1
Cytochrome c oxidase subunit Vib	Cyclin B1
14 ku beta-galactoside-binding lectin	dUTPase
OK/SW-CL.19	Platelet glycoprotein IX precursor
Polyamine oxidase isoform-3	Prefoldin subunit 3
Ki nuclear autoantigen	Annexin A8
Proteasome activator subunit 3	Cyclin-dependent kinase 4 inhibitor A
Aflatoxin B1-aldehyde reductase	Chain A, Human Peroxiredoxin 5
Epsilon subunit of coatomer protein complex isoform b	Peptidylprolyl isomerase A; cyclophilin A
N-methyl-D-aspartate receptor subunit	Urokinase-type plasminogen activator receptor
Trafficking protein particle complex 6B	



图 4 LST-R1、SW480 和 LoVo 三种细胞中 dUTPase 的表达 (SP×400)

Figure 4 Expression of dUTPase in LST-R1, SW480, and LoVo cells (SP×400)

A: dUTPase is expressed in cytoplasm of LST-R1 cells.

B: dUTPase is expressed in cytoplasm and nuclei of SW480 cells, mainly in nuclei.

C: dUTPase is expressed in cytoplasm and nuclei of LoVo cells, mainly in nuclei.

变侧向扩散、较少侵袭性生长的联系不明确。有意义的是 Yamada 等^[13]发现非息肉样结直肠癌的深层细胞凋亡指数高于浅层细胞,推测病变不同部位层次细胞凋亡的差异与 CLST 侧向扩散而非垂直生长有关。但是我们认为 CLST 的独特生长方式形成机制远非如此简单。在我国,CLST 为第一军医大学南方医院消化病研究所姜泊等^[15]首次报道,在 1920 名作大肠镜检查的患者中,发现 CLST 患者 25 例,其检出率为 0.8%,提示 CLST 在我国并不少见。因此该课题组开展了 CLST 的基础研究,首次成功地进行 CLST 细胞体外培养、建株和检测癌基因表达等方面的研究^[3],提供了细胞模型 LST-R1,并在此基础上分析了 LST-R1 细胞株相对于常见肿瘤细胞株差异基因表达谱^[16]。本实验利用蛋白质组学方法在蛋白质表达谱层面深入该课题的研究。

综合分析 LST-R1、SW480 和 LoVo 细胞株 pH4~7 IPG 胶条 2-DE 图谱,发现多数蛋白质的分布和表达量是相似的,这表明 CLST 也表达一般大肠肿瘤所具有的蛋白质表达谱,提示 CLST 具有常见大肠肿瘤的大部分特性。另外我们发现在 LST-

R1 和 SW480 细胞 2-DE 图谱间存在(96±7)个蛋白质差异点,其中(50±6)个点仅在 LST-R1 细胞株中表达或表达明显增强,(47±5)个点仅在 SW480 细胞中表达或表达明显增强;而在 LST-R1 和 LoVo 细胞 2-DE 图谱间存在(108±10)个蛋白质差异点,其中(56±8)个点仅在 LST-R1 细胞株中表达或表达明显增强,(52±11)个点仅在 LoVo 细胞中表达或表达明显增强。我们推测一些涉及细胞粘附、迁移运动和侵袭生长的蛋白质的表达可能存在差异。

在以上差异点中,我们选择了 40 个差异蛋白质斑点进行 MALDI-TOF 质谱分析,获得了一系列的 PMFs。继而联合从 2-DE 图谱获得的蛋白质相关属性如等电点和分子量进行蛋白质库搜索,共鉴定出 19 个蛋白质。这些蛋白质功能涉及细胞增殖、凋亡和粘附,其中我们感兴趣的有 GAL1、dUTPase、uPAR 和外被蛋白等。dUTPase 在 LST-R1、SW480 和 LoVo 细胞中表达依次增高,这与 Fleischmann 等^[17]报道 dUTPase 在原发性无淋巴结转移大肠癌表达明显低于有淋巴结转移的大肠癌相一致,提示 dUTPase 参与大肠癌侵袭转移病程演进过程。采用

免疫组化分析表明 LST-R1、SW480 和 LoVo 细胞株均表达 dUTPase 蛋白,SW480 和 LoVo 表达部位以胞核为主,但 LST-R1 细胞以胞浆表达为主,表达强度 LoVo>SW480>LST-R1, 这种表达强度和表达部位的差异是否与 CLST 独特的生长方式有关,这将是我们将进一步研究的重点。尿激酶型纤溶酶原激活剂受体 (urokinase-type plasminogen receptor, uPAR) 是一种多功能蛋白质,在肿瘤的侵袭转移和血管形成中发挥重要的作用。有研究认为,uPAR 的高表达与原发大肠癌的远处转移呈正相关,而与大肠癌患者的生存率呈负相关,认为 uPAR 在大肠癌的发展、肿瘤的侵袭及转移过程中起着重要的作用^[18]。而在本实验中,uPAR 在 LST-R1、SW480 和 LoVo 细胞中表达依次增强,与文献报道结果^[18]一致。外被蛋白是 ARF1 相互作用的蛋白质网络中的下游蛋白^[19],其在三种细胞的表达梯度与 ARF1 相同。在已进行的研究工作中,我们发现 ARF1 与 CLST 侧向生长有一定的关系^[20]。因此我们认为该蛋白质网络系统可能在 CLST 病变的发展中发挥一定的作用。本研究中发现另一重要差异表达蛋白为 galectin-1,文献报道 galectin-1 为一分子量约为 14.5 ku 的同源二聚体,在细胞粘附、增殖调控和免疫反应中发挥功能,在多种肿瘤侵袭和转移中发挥重要作用^[21],在大肠癌侵袭和转移中发挥一定的作用^[22]。

本研究利用蛋白质组学方法分析了 CLST 细胞系 LST-R1 细胞和常见大肠癌细胞蛋白质表达谱,初步鉴定出 19 个差异表达蛋白质。结合已有文献,我们认为部分蛋白质与癌症侵袭转移存在密切联系。对这些差异蛋白进一步进行功能分析,一方面可探知 CLST 侧向生长可能分子机制,同时对大肠癌侵袭转移研究亦可能具有潜在的意义。

[参 考 文 献]

- [1] 寺井毅,今井靖,二瓶英人,等. LSTの臨床的意義(3) 臨床病理學的検討かうみたその特殊性 [M]. 早期大腸癌, 1998,2(5):505-516.
- [2] Tanaka S, Haruma K, Oka S, et al. Clinicopathologic features and endoscopic treatment of superficially spreading colorectal neoplasms larger than 20 mm [J]. *Gastrointest Endosc*, 2001, 54(1):62-66.
- [3] 赖卓胜,韩宇晶,刘思德,等. 大肠侧向发育型肿瘤细胞株的建立及其鉴定[J]. *解放军医学杂志*, 2004,29(11):934-937.
- [4] Görg A, Obermaier C, Boguth G, et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients [J]. *Electrophoresis*, 2000,21(6):1037-1053.
- [5] Kudo S, Kashida H, Nakajima T, et al. Endoscopic diagnosis and treatment of early colorectal cancer [J]. *World J Surg*, 1997,21(7):694-701.
- [6] 工藤進英. Early colorectal cancer-detection of depressed types of colorectal carcinoma. P50-51 [M]. Tokyo: Igaku-shoin Medical Publisher, Inc. 1996.
- [7] Yamauchi T, Watanabe M, Hasegawa H, et al. Serrated adenoma developing into advanced colon cancer in 2 years [J]. *J Gastroenterol*, 2002,37(6):467-470.
- [8] 姜泊,刘思德,智发朝,等. 染色内镜和放大内镜诊治大肠侧向发育型肿瘤[J]. *中华内镜杂志*, 2003,20(1):9-12.
- [9] Yoshikane H, Hidano H, Sakakibara A, et al. Endoscopic resection of laterally spreading tumours of the large intestine using a distal attachment [J]. *Endoscopy*, 1999,31(6):426-430.
- [10] Noro A, Sugai T, Habano W, et al. Analysis of Ki-ras and p53 gene mutations in laterally spreading tumors of the colorectum [J]. *Pathol Int*, 2003,53(12):828-836.
- [11] Yamashita K, Arimura Y, Shimizu H, et al. Increased cyclooxygenase-2 expression in large flat colorectal tumors (laterally spreading tumors) [J]. *J Gastroenterol*, 2003,38(1):69-73.
- [12] Yamashita K, Arimura Y, Shimizu H, et al. Increased cyclooxygenase-2 expression in large flat colorectal tumors (laterally spreading tumors) [J]. *J Gastroenterol*, 2003,38(1):69-73.
- [13] Yamada H, Hasegawa H, Iino H, et al. Evaluation of apoptosis as a factor affecting the growth of non-polypoid colorectal adenomas [J]. *J Int Med Res*, 2001,29(6):516-522.
- [14] Tanimoto T, Tanaka S, Haruma K, et al. Growth patterns in various macroscopic types of noninvasive intramucosal colorectal carcinoma with special reference to apoptosis and cell proliferation [J]. *Dis Colon Rectum*, 1998,41(11):1376-1384.
- [15] 姜泊,刘思德,智发朝,等. 大肠侧向发育型肿瘤 25 例诊治报告 [J]. *第一军医大学学报*, 2002,22(2):189-190.
- [16] 王新颖,姜泊,赖卓胜,等. 基因芯片筛选大肠侧向发育型肿瘤相关基因的初步研究 [J]. *第一军医大学学报*, 2004,24(9):1023-1025.
- [17] Fleischmann J, Kremmer E, Müller S, et al. Expression of deoxyuridine triphosphatase (dUTPase) in colorectal tumours [J]. *Int J Cancer*, 1999,84(6):614-617.
- [18] Yang J L, Seetoo D, Wang Y, et al. Urokinase-type plasminogen activator and its receptor in colorectal cancer: independent prognostic factors of metastasis and cancer-specific survival and potential therapeutic targets [J]. *Int J Cancer*, 2000,89(5):431-439.
- [19] Szafer E, Pick E, Rotman M, et al. Role of coatmer and phospholipids in GTPase-activating protein-dependent hydrolysis of GTP by ADP-ribosylation factor-1 [J]. *J Biol Chem*, 2000,275(31):23615-23619.
- [20] 马文敏,姜泊,赖卓胜,等. 大肠侧向发育型肿瘤细胞株 ADP-核糖基化因子 1 的表达及其意义 [J]. *癌症*, 2005,24(6):690-694.
- [21] Perillo N L, Marcus M E, Baum L G. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death [J]. *J Mol Med*, 1998,76(6):402-412.
- [22] Nagy N, Legendre H, Engels O, et al. Refined prognostic evaluation in colon carcinoma using immunohistochemical galectin fingerprinting [J]. *Cancer*, 2003,97(8):1849-1858.

[编辑及校对:甘可建]