DOI:10.16016/j.1000-5404.201606108

人原发性肝癌相关抗原的蛋白质组学初步研究

王江红[1],李启英[2],石 洋[2],黄德鸿[2],南映瑜[2],杨 涛[2],肖春燕[2],王 莉[2],张文军[2],龚 奕[2],项 颖[2]
(400030 重庆,重庆市肿瘤研究所:血液肿瘤消化呼吸内科[1],血液肿瘤生物治疗科[2])

[摘要] **目的** 检测肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)的相关抗原,并予以验证。**方法** 分别提取15例HCC组织及其癌旁组织总蛋白。Western blot分别检测各总蛋白与其HCC患者自体血清的杂交情况。双向电泳(two-dimensional electrophoresis,2-DE)技术将15例混合总蛋白中的各蛋白进行分离与染色。图像分析法比对染色胶上HCC组织及其癌旁组织蛋白的表达差异,基质辅助激光解吸/电离飞行时间二级质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight with two mass analyzers for tandem mass spectrometry,MALDI-TOF MS/MS)技术及生物信息学网络数据库分别对表达差异蛋白予以分析鉴定与检索匹配,免疫组织化学与Western blot分别检测该差异蛋白在人HCC组织及其癌旁组织中的变化情况。**结果** 2-DE染色胶图像分析比对结果显示,HCC及其癌旁组织蛋白表达差异斑点共90个,MALDI-TOF MS/MS与数据库对其中19个蛋白斑点分析鉴定与检索匹配发现15个蛋白表达上调,4个蛋白表达下调。免疫组织化学与Western blot检测结果显示,与对照比较,上调蛋白中的DnaJ同源B亚家族成员11(dnaJ homolog subfamily B member 11,DNAJB11)在HCC组织中的表达明显增强,下调蛋白中的蛋白酶体亚基α3(proteasome subunit alpha type 3,PSMA3)在HCC组织中的表达则相反。**结论** 人原发性肝癌相关抗原DNAJB11在HCC组织中的表达上调,PSMA3在HCC组织中的表达下调。

[关键词] 肝细胞癌;蛋白组学;相关抗原;DnaJ同源B亚家族成员11;蛋白酶体亚基α3
[中图法分类号] R392.11;R394.3;R735.7 [文献标志码] A

Detection and validation of hepatocelluar carcinoma associated antigens by proteomics

Wang Jianghong[1], Li Qiying[2], Shi Yang[2], Huang Dehong[2], Nan Yingyu[2], Yang Tao[2], Xiao Chunyan[2], Wang Li[2], Zhang Wengjun[2], Gong Yi[2], Xiang Ying[2] ([1]Department of Hematological Oncology and Respiratory Diseases, [2]Department of Biotherapy for Hemato-oncology, Chongqing Cancer Institute, Chongqing, 400030, China)

[**Abstract**] **Objective** To detect and validate the new specific antigens associated with hepatocelluar carcinoma (HCC). **Methods** Total proteins from 15 HCC tissues and their adjacent tissues were extracted respectively. Western blotting was used to detect the interactions between the total proteins and autologous serums of the 15 HCC patients. Various proteins of the 15 mixed total proteins were separated and dyed by two-dimensional electrophoresis (2-DE). Image analysis was employed to compare the expression differences of proteins extracted from HCC tissues and those from their adjacent tissues. The obtained proteins with different expression levels were analyzed and identified with matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight with two mass analyzers for tandem mass spectrometry (MALDI-TOF MS/MS), and searched for their sequences in bioinformatics network database, and then confirmed by immunohistochemical assay and Western blotting respectively. **Results** The results of image comparison from 2-DE dyeing proteins revealed that a total of 90 protein spots with different expression levels were found. And among the 19 protein spots eventually

[基金项目] 重庆市应用开发计划项目(CSTC 2014yykfA110031);中国医师协会研究项目(ZGYSXH20120701)
[通信作者] 项 颖,E-mail:1324339678@qq.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160831.1410.005.html

identified by MALDI-TOF MS/MS, 15 proteins were up-regulated, and 4 down-regulated. Immunohistochemical assay and Western blotting confirmed that compared with the proteins from the adjacent tissues, DnaJ homolog subfamily B member 11 (DNAJB11) was significantly enhanced in these up-regulated proteins, and proteasome subunit alpha type 3 (PSMA3) was the most obviously down-regulated protein from HCC tissues. **Conclusion** Hepatocelluar carcinoma associated antigen, DNAJB11 is up-regulated, while PSMA3 is down-regulated in the HCC tissue.

[**Key words**] hepatocelluar carcinoma; proteomics; associated antigens; DnaJ homolog subfamily B member 11; proteasome subunit alpha type 3

Supported by the Application and Development Project of Chongqing (CSTC2014yykfA110031) and the Research Project of Chinese Medical Doctor Association (ZGYSXH20120701). Corresponding author: Xiang Ying, E-mail: 1324339678@qq.com

肿瘤抗原(tumor antigens,TAs)是肿瘤细胞不同于正常细胞的基因表达产物,能有效地诱导机体针对瘤细胞产生体液免疫和细胞免疫应答,是肿瘤免疫治疗的分子基础,可对恶性肿瘤的诊断、治疗及监测提供靶分子[1]。恶性肿瘤是高发病率与高病死率性疾病,严重威胁人类健康,且其发病率和病死率呈逐年上升趋势。肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)是亚洲最致命的癌症,是全球恶性肿瘤患者中位居第二的常见死亡病因,同其他癌症比较,其治疗手段更为受限,且预后更差,确诊患者的生存期最多是 1 年[2]。HCC 高病死率的原因主要是其早期诊断缺乏敏感的检测手段所致[3-5]。本实验采用双向凝胶电泳、Western blot、质谱鉴定等蛋白质组学技术检测 HCC 的相关 TAs,并采用免疫组织化学与 Western blot 检测予以验证,以期为 HCC 的早期诊断和治疗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 样本收集

未经化疗、放疗等治疗的 HCC 患者手术组织样本 30 例(其中 HCC 组织及其对应的癌旁组织各 15 例)及其 HCC 组织和对应癌旁组织的血液样本各15 例。全血采集 10~15 mL,于 4 ℃过夜静置后,1 000×g 离心 20 min 收集血清并分装成 5~8 管,于 -80 ℃保存备用。手术切下的每例 HCC 及其癌旁组织被大部分分装成 5~8 份(30 mg/份)冻存于液氮内备用,小部分(0.6 cm×0.2 cm×0.4 cm)固定于 10% 中性甲醛内进行常规病理制片,镜检鉴定其癌变情况。本研究经本所(重庆市肿瘤医院)伦理委员会审核同意,患者均签署知情同意书。

1.2 主要试剂

蛋白酶抑制剂(PMSF)、胎牛血清标准品(BSA)、二硫苏糖醇 DTT、十二烷基硫酸钠(SDS)、N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED)、过硫酸铵(AP)、低熔点琼脂糖、乙腈、胰酶、三氟乙酸(TFA)、HCCA、Acylamide 购自 Amresco 公司;Tris-base、Glycine、Urea、Tris-HCl、Thiourea、CHAPs、Acetone、IPG、Bromophenol blue、Glycerol、Tween-20 购自 Promega 公司;drystrip、cover oil、paper wick 购自 GE 公司;高灵敏度化学发光检测试剂、Nitrocellulose Blotting Membrane 购自 Life Science 公司;G250 购自 Bio Basic 公司;X 线胶片购自柯达公司;N,N'-methylenebisacrylamide 购自 Sigma 公司;DNAJB11 兔多克隆抗体(ab75107)与 PSMA3(ab109532)兔单克隆抗体购自 Abcam 公司;免疫组化即用型检测试剂盒、胃蛋白酶消化液及 DAB 显色试剂盒购自中杉公司。

1.3 方法

1.3.1 组织总蛋白的制备与定量 分别从液氮中取出冻存的 30 例组织(HCC 及其癌旁组织各 15 例)各 30 mg,放入盛有液氮的研钵中研磨至粉末,加入裂解液充分溶解粉末,4 ℃,离心 20 min(12 000 r/min),收集上清,上清经超声破碎核酸,丙酮 -20 ℃过夜沉淀等以纯化蛋白,并予以定量。

1.3.2 HCC、对应的癌旁组织与其自体血清相互作用的有效性验证 采用 Western blot 分别将各 HCC 及其癌旁组织总蛋白转移至 NC 膜,5% 脱脂奶室温封闭 1 h 后,与患者自体血清(一抗:1∶100~1∶900)杂交 3~20 h,添加酶标记的羊抗人 IgG(二抗:1∶2 000),室温孵育 3 h 后同发光底物结合 7 min 左右,压片、曝光、显影与定影,GAPDH(相对分子质量为 3.7×10^4)作内参,检测 HCC、对应的癌旁组织与其自体血清的相互作用情况。

1.3.3 2-DE 检测与电泳胶固定 将经定量的 15 份 HCC 组织总蛋及其 15 份癌旁组织总蛋白各混合成 1 份样品。准备好水化盘,吸取上样液(相应量的混合总蛋白样品、1% DTT、1% IPG Buffer、1× BPB、RB)加置水化盘槽底。从冰箱取出干胶条放入水化盘槽中于室温 20 ℃水化浸泡 10~12 h 后进行等电聚焦(一向电泳):S1 stp 500 V 1 h→S2 grd 1 000 V 1 h→S3 grd 8 000 V 3 h→S4 stp 8 000 V 2 h 30 min,总电压时间积约 60 kVh。去离子水洗涤胶条,分别用含 100 mmol/L

DTT 与 250 mmol/L iodoacetamide 的平衡液(50 mmol/L Tris-HCl、6 mol/L Urea、30% Glycerol、2% SDS、0.002% Bromophenol blue)平衡胶条 15 min。平衡后的胶条采用 SDS-PAGE 进行垂直电泳,即二向电泳:S1 2 W/gel 60 min→S2 17 W/gel 约 4 h 30 min(溴酚蓝前沿达玻璃板下沿时停止电泳)。电泳结束后,用去离子水洗涤胶块 3 次,放入固定液,室温固定 2~3 h。每份混合总蛋白样品同时制备 3 张 2-DE 凝胶,其中 2 张用于染色(银染与考染),余下 1 张用于 Western blot 转膜。

1.3.4 2-DE 胶染色与图像采集 取 HCC 或其癌旁样本 2-DE 凝胶,用硝酸银染色 60 min,以检测鉴定样本是否合格。取 HCC 及其癌旁样本 2-DE 凝胶,用考马斯亮蓝 G-250 染色 6~8 h,用于质谱鉴定。将背景清晰的 2-DE 染色胶进行扫描并保存图像。扫描后的凝胶用保鲜膜包好,置于 4 ℃备用。

1.3.5 2-DE-Western blot 检测 分别取未染色的 HCC 及其癌旁样本的 2-DE 凝胶,将经 2-DE 分离的蛋白转移至 NC 膜上,余同 1.3.2。

1.3.6 图像分析与质谱鉴定 采用图像分析软件 Image Master 2D platinum 5.0 对 HCC 及其癌旁组织蛋白的 2-DE-Western blot 图像予以分析比对,寻找感兴趣的蛋白斑点。根据比对结果在相应的 2-DE 考染胶上挖取相应的蛋白斑点进行脱色、脱水、酶切、肽段抽提及点靶,采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(Ultraflex Ⅲ TOF/TOF)进行检测(UV 波长:355 nm,重复速率:200 Hz,加速电压:20 000 V,最优质量分辨率:1 500。扫描质量范围:700~3 200),利用 flexAnalysis 软件过滤基线峰、识别信号峰以获得肽质量指纹图谱,以软件 BioTools 检索 uniprot 等数据库,寻找相关匹配蛋白,并查询其功能。

1.3.7 HCC 相关 TAs 的免疫组织化学检测验证 15 例人 HCC 及其癌旁组织包埋在一起形成组织芯片,制成 4 μm 的石蜡切片,采用 HCC 相关 TAs 抗体与即用型检测试剂盒对 HCC 相关 TAs 进行抗原染色,胃蛋白酶消化液消化以修复抗原,DAB 显色试剂盒显色,具体按各试剂盒说明书进行。

1.3.8 HCC 相关 TAs 的 Western blot 验证 采用 Western blot,将 HCC 及其癌旁组织总蛋白转移至 NC 膜上,浸于含 HCC 相关 TAs 抗体的封闭液,4 ℃过夜,添加酶标记的相应二抗,室温孵育 1.5 h,同底物于 25 ℃ 结合 7~10 min,β-actin(相对分子质量为 4.3×10^4)作内参。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,2 组间比较采用 t 检验,多组间差异行方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 组织样本的癌变情况镜检鉴定

常规病理制片镜检结果显示,HCC 患者的 HCC 及其癌旁组织样本符合要求,可用于后续实验(图 1)。

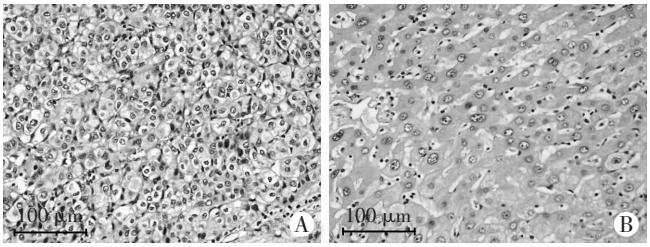


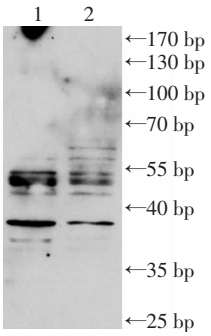
图 1 人 HCC(A)及其癌旁组织(B)病理学变化 (HE)

2.2 HCC 及其癌旁组织与自体血清相互作用的有效性验证

用一抗(自体血清)对 HCC 或其癌旁组织蛋白进行 Western blot 检测,均能曝光出清晰的条带(图 2)。结果显示,自体血清与其 HCC 或其癌旁组织蛋白均能良好结合,检测样本合格,可进行后续实验。

2.3 2-DE 胶染色检测

取 HCC 或癌旁组织蛋白跑一张双向电泳胶银染,检测结果显示,斑点分离清晰,样本未见蛋白降解(图 3),提示组织样本合格,可以进行后续实验。



1:HCC 癌旁组织;2:HCC 组织

图 2 Western blot 检测人 HCC 及其癌旁组织蛋白与自体血清的相互作用

2.4 图像分析与质谱选点

HCC 及其癌旁组织蛋白分别与血清杂交后,其 NC 膜上可见多个蛋白斑点,其中有些斑点是转有 HCC 组织蛋白的 NC 膜独有的,有些是两者共有的。采用图像分析软件对 2-DE-Western blot 图像与 2-DE 考染胶图像进行分析,比对出 HCC 组织蛋白上调的斑点 33 个,下调的斑点 57 个。从这些上、下调的斑点中筛选到 19 个蛋白斑点用于质谱检测,其中编号 1~11

是转有 HCC 组织蛋白的 NC 膜独有的斑点(图 4A),编号 A01-A08 是两者共有的斑点(图 4B)。



图 3 人 HCC 组织蛋白的双向电泳胶银染预实验检测结果

2.5 蛋白斑点的质谱检测与分析

通过比对分析 HCC 及其癌旁组织蛋白的 2-DE-Western blot 图像(图 4)与 2-DE 考染胶(图 5)后,挖出19个斑点进行脱色、脱水、酶切、肽段抽提、点靶及 MALDI-TOF MS/MS 质谱分析,获得肽指纹图谱。指纹图谱优势峰明显、间隔均匀、基线平稳(图 6),并发现 15 个蛋白表达上调,4 个蛋白表达下调(表 1)。文献检索分析显示,上调蛋白中的 DnaJ 同源 B 亚家族成员 11(dnaJ homolog subfamily B member 11, DNAJB11)和下调蛋白中的蛋白酶体亚基 α3 (proteasome subunit alpha type 3, PSMA3)在 HCC 相关抗原研究领域未见报道,由此提示,DNAJB11、PSMA3 可能是 HCC 的相关抗原。

2.6 HCC 相关 TAs 的免疫组织化学检测验证

组织芯片的免疫组织化学检测证实,15 份 HCC 组织中有 4 份可见较强的 DNAJB11 抗原表达(图 7A),这 4 份 HCC 组织对应的癌旁组织的 DNAJB11 抗原表达则较弱(图 7B);15 份 HCC 组织中有 3 份可见较弱的 PSMA3 抗原表达(图 7A),而这 3 份 HCC 组织对应的癌旁组织的 PSMA3 抗原均高表达(图 8B)。由此提示,DNAJB11、PSMA3 可能是 HCC 的相关抗原。

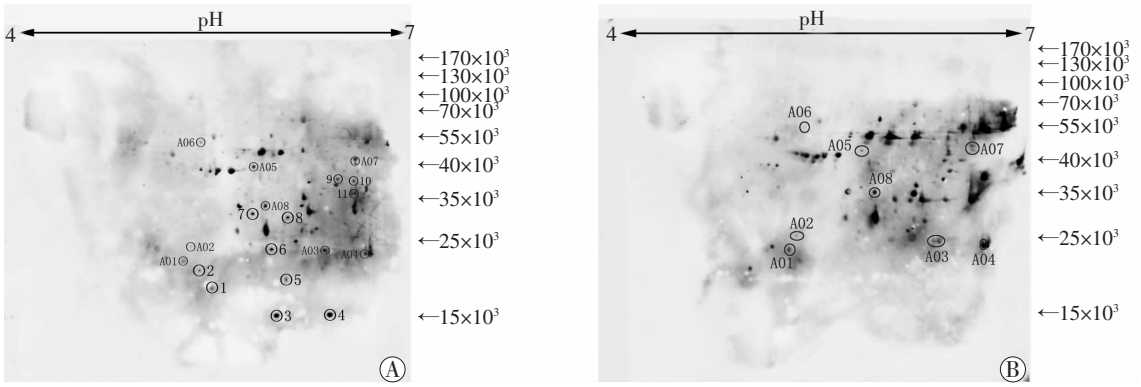


图 4 2-DE-Western blot 检测人 HCC 组织(A)及其癌旁组织(B)的差异蛋白

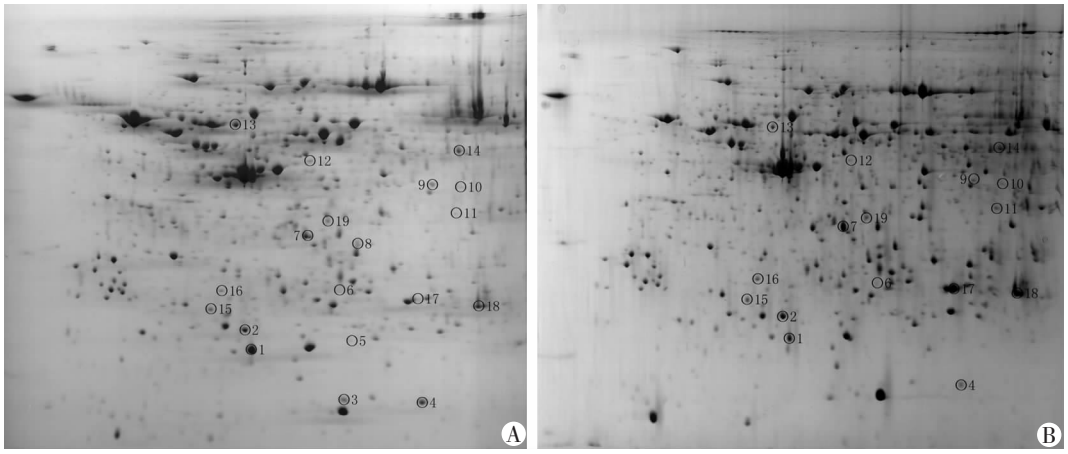


图 5 人 HCC 组织(A)及其癌旁组织(B)蛋白的双向电泳考染胶结果比较

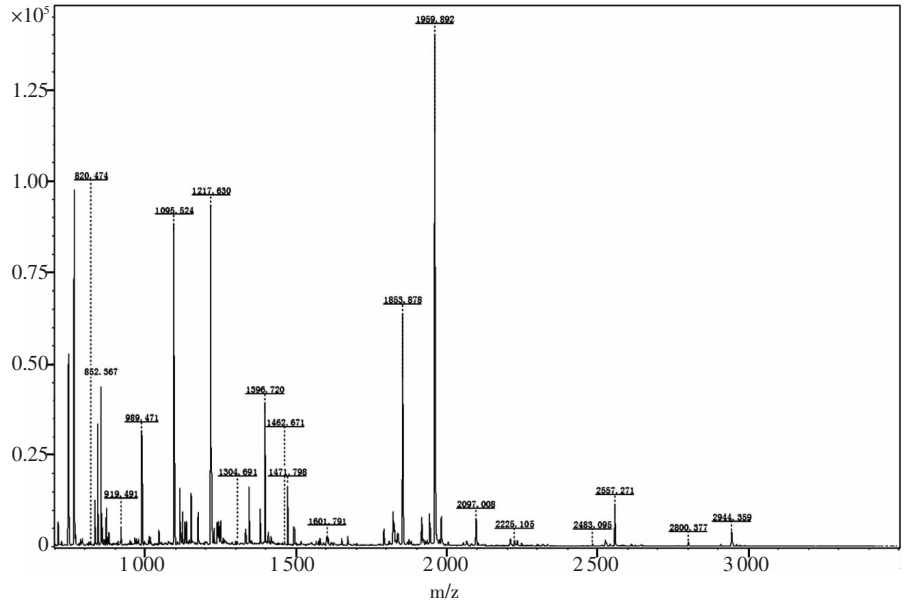


图 6　人肝癌组织阳性蛋白斑点的肽质量指纹图

表 1　人 HCC 及其癌旁组织的差异表达蛋白

编号	登录号	蛋白名称	分数	匹配上的多肽数目	变化趋势
1	A0A0C4DGV7_HUMAN	Retinol-binding protein 4	138	13	上调
2	APOA1_HUMAN	Apolipoprotein A-I	296	25	上调
3	J3KRH2_HUMAN	Haptoglobin (Fragment)	143	5	上调
4	J3KRH2_HUMAN	Haptoglobin (Fragment)	74	5	上调
5	A0A087WUQ6_HUMAN	Glutathione peroxidase	87	9	上调
6	CLPP_HUMAN	ATP-dependent Clp protease proteolytic subunit, mitochondrial	109	8	上调
7	ST2A1_HUMAN	Bile salt sulfotransferase	129	15	上调
8	ANXA4_HUMAN	Annexin A4	344	20	上调
9	DJB11_HUMAN	DnaJ homolog subfamily B member 11	182	17	上调
10	PDIA6_HUMAN	Protein disulfide-isomerase A6	207	10	上调
11	LASP1_HUMAN	LIM and SH3 domain protein 1	74	12	上调
12	NDRG1_HUMAN	Protein NDRG1	140	13	上调
13	D6RF35_HUMAN	Vitamin D-binding protein	319	23	上调
14	ENOA_HUMAN	Alpha-enolase	165	12	上调
15	GDIR2_HUMAN	Rho GDP-dissociation inhibitor 2	164	11	上调
16	PSA3_HUMAN	Proteasome subunit alpha type-3	177	16	下调
17	ECHM_HUMAN	Enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	228	14	下调
18	PRDX6_HUMAN	Peroxiredoxin-6	228	15	下调
19	CAZA2_HUMAN	F-actin-capping protein subunit alpha-2	141	10	下调

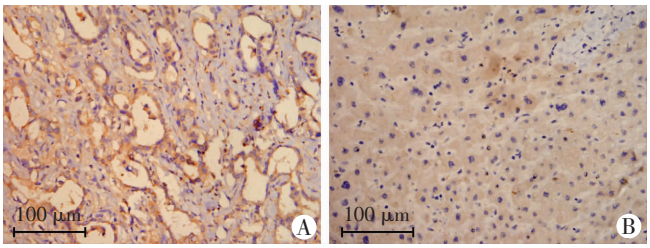


图 7　免疫组化染色观察人 HCC(A)及其癌旁组织(B)的相关抗原 DnaJB11　(S-P)

2.7　HCC 相关 TAs 的 Western blot 验证

Western blot 检测结果证实,15 份 HCC 组织中有 4 份(2、4、6、8)在相对分子质量 4.0×10^4 处可见较强的 DNAJB11 抗原染色带,这 4 份 HCC 组织对应的癌旁组织(1、3、5、7)在相对分子质量 4.0×10^4 处的 DNAJB11 抗原染色带则较弱(图 9);15 份 HCC 组织中有 3 份(2、4、30)在相对分子质量 2.7×10^4 处可见较弱的 PSMA3 抗原染色带,而这 3 份 HCC 组织对应

的癌旁组织(1、3、29)在相对分子质量 2.7×10^4 处出现的 PSMA3 抗原染色带则均较强(图 9)。由此提示,DNAJB11、PSMA3 可能是 HCC 的相关抗原。

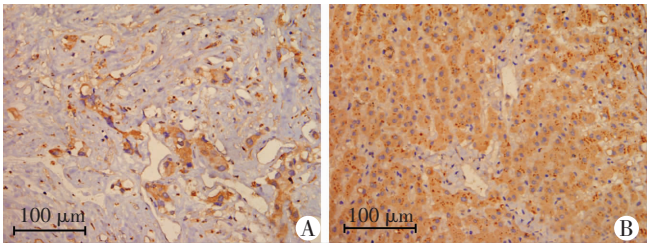


图 8 免疫组织化学染色观察人 HCC(A)及其癌旁组织(B)的相关抗原 PSMA3 (S-P)

3 讨论

运用针对肿瘤细胞反应的细胞毒 T 淋巴细胞所鉴定出的人与小鼠的肿瘤抗原,证实了肿瘤特异性抗原(tumor specific antigens TSAs)的存在。由于研究手段的不断发展与创新,所发现的 TSAs 不断增加,有些已在临床研究中展示了其良好的疗效。因此,在肿瘤组织、细胞中,种类繁多、特性各异的 TSAs 吸引着人们不断地探索、挖掘[7],以期能找到特异性更好、功能更强的 TSAs(新 TSAs)用于临床,达根除肿瘤之目的。

蛋白质组学是横跨基因组和临床应用鸿沟的桥梁,可直接从蛋白的整体水平,动态定量观测肿瘤的发生、发展过程中其蛋白的变化情况,这些变化可能发生在蛋白表达水平、表达位置、组成成分或/和 DNA 翻译后的修饰上。近些年来,随着生物技术,尤其是蛋白质组学技术的发展,使得肿瘤新 TSAs 的筛选与鉴定不断迈上新台阶,为肿瘤的治疗提供了新的手段。因此,探寻有利于肿瘤诊断、治疗的新 TSAs 已成为目前的研究热点之一。

我们通过血清蛋白质组学技术探检 HCC 的新 TSAs,先用双向电泳分离 HCC 及其癌旁组织蛋白,再用 Western blot 将自体血清中的抗体与 HCC 及其癌旁组织抗原分子杂交,结果显示,HCC 及其癌旁组织蛋白表达差异斑点共 90 个。采用二级质谱技术对其中 19 个蛋白斑点分析鉴定,获得 DnaJB11 与 PSMA3 抗原分子,即 HCC 患者的血清中存在抗 DnaJB11 与抗 PSMA3 的抗体,提示 DnaJB11 与 PSMA3 可能是 HCC 的新 TSAs。

DnaJB11 属于 Hsp70 家族 BiP 成员,是丰富的可溶性内质网驻留的分子伴侣蛋白。分子伴侣有利于新合成蛋白的折叠,受损蛋白的复性,蛋白在胞内的运输,以及错误折叠蛋白到降解系统的交付[8]。与大多数 ER 驻留的分子伴侣不同,DnaJB11 缺乏 C 末端内质网滞留信号序列(KDEL),在其正常的驻留环境外发挥蛋白平衡调控作用[9],能在胞外识别蛋白的聚集并为该聚集保驾护航,能激活 BiP 的 ATP 酶活性以增加 BiP 与底物蛋白的亲和性,调控 BiP 的底物蛋白向 BiP 传递[10]。另有研究显示,DnaJB11 还参与氧化应激介导的炎症反应[11],在促进或维持一个被称作 K1 的病毒跨膜蛋白的抗凋亡功能中有着极其重要的作用[12],在口腔鳞状细胞癌中的表达明显上调[13]。

蛋白酶体在所有真核细胞的蛋白降解中起着重要作用[14]。蛋白酶体 26S 是机体内负责蛋白降解的分子机器,由 19S 调节颗粒与 20S 核心颗粒构成。前者识别具有泛素链标签的底物蛋白,并对其予以去折叠,最后将去折叠的底物蛋白送至后者中降解。蛋白酶体亚基 α3(PSMA3)是 20S 核心颗粒的重要成分,可在一定程度上增加抑癌基因 Bim 的表达而诱导 HEK293 亚细胞的凋亡,还与肿瘤高表达的 PAI-1、AGR2 等基因密切相关[15-16]。

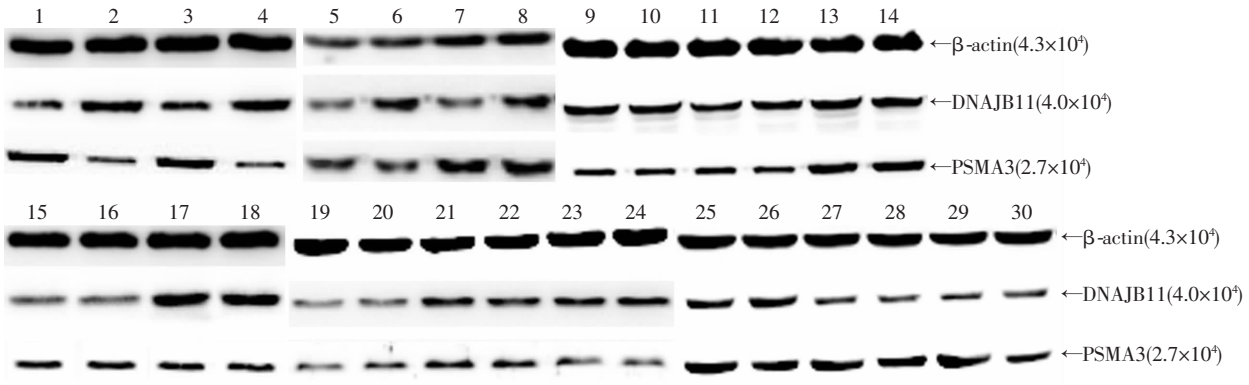


图 9 Western blot 检测 HCC 相关抗原 DNAJB11、PSMA3 的表达

本实验采用双向凝胶电泳、Western blot、质谱鉴定等蛋白质组学技术检测到 DnaJB11、PSMA3 在 HCC 组织及其癌旁组织中的明显差异表达。采用免疫组织化学与 Western blot 检测结果显示,与对照比较,DNAJB11 在 HCC 组织中明显高表达,PSMA3 在 HCC 组织的中表达显著降低。这提示 DnaJB11、PSMA3 可能是 HCC 的相关抗原。进一步的研究将探讨 DnaJB11、PSMA3 在 HCC 早期诊断与治疗中的作用及其机制。

参考文献:

[1] Chua M L, Wee J T, Hui E P, *et al*. Nasopharyngeal carcinoma[J]. Lancet, 2016, 387(10022): 1012 – 1024. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)00055-0

[2] Lin K T, Shann Y J, Chau G Y, *et al*. Identification of latent biomarkers in hepatocellular carcinoma by ultra-deep whole-transcriptome sequencing[J]. Oncogene, 2014, 33(39): 4786 – 4794. DOI:10.1038/onc.2013.424

[3] Khan F Z, Perumpail R B, Wong R J, *et al*. Advances in hepatocellular carcinoma: Nonalcoholic steatohepatitis-related hepatocellular carcinoma[J]. World J Hepatol, 2015, 7(18): 2155 – 2161. DOI: 10.4254/wjh.v7.i18.2155

[4] Amr K S, Ezzat W M, Elhosary Y A, *et al*. The potential role of miRNAs 21 and 199-a in early diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. Gene, 2016, 575(1): 66 – 70. DOI: 10.1016/j.gene.2015.08.038

[5] Wen Y, Han J, Chen J, *et al*. Plasma miRNAs as early biomarkers for detecting hepatocellular carcinoma[J]. Int J Cancer, 2015, 137(7): 1679 – 1690. DOI:10.1002/ijc.29544

[6] Ismail S, Mayah W, Battia H E, *et al*. Plasma nuclear factor kappa B and serum peroxiredoxin 3 in early diagnosis of hepatocellular carcinoma[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(4): 1657 – 1663. DOI:10.7314/apjcp.2015.16.4.1657

[7] Dai L, Lei N, Liu M, *et al*. Autoantibodies to tumor-associated antigens as biomarkers in human hepatocellular carcinoma (HCC)[J]. Exp Hematol Oncol, 2013, 2(1):15. DOI:10.1186/2162-3619-2-15

[8] Kim Y E, Hipp M S, Bracher A, *et al*. Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis[J]. Annu Rev Biochem, 2013, 82: 323 – 355. DOI:10.1146/annurev-biochem-060208-092442

[9] Buck T M, Brodsky J L. Escaping the endoplasmic reticulum: why does a molecular chaperone leave home for greener pastures[J]. EMBO J, 2015, 34(1): 1 – 3. DOI: 10.15252/embj.201490462

[10] Guo F, Snapp E L. ERdj3 regulates BiP occupancy in living cells[J]. J Cell Sci, 2013, 126(Pt 6): 1429 – 1439. DOI:10.1242/jcs.118182

[11] Sinz N, Rodr guez A, Catalán V, *et al*. Leptin administration downregulates the increased expression levels of genes related to oxidative stress and inflammation in the skeletal muscle of ob/ob mice[J]. Mediators Inflamm, 2010, 2010: 784343. DOI:10.1155/2010/784343

[12] Wen K W, Damania B. Hsp90 and Hsp40/Erdj3 are required for the expression and anti-apoptotic function of KSHV K1[J]. Oncogene, 2010, 29(24): 3532 – 3544. DOI:10.1038/onc.2010.124

[13] Hsu C W, Yu J S, Peng P H, *et al*. Secretome profiling of primary cells reveals that THBS2 is a salivary biomarker of oral cavity squamous cell carcinoma[J]. J Proteome Res, 2014, 13(11): 4796 – 4807. DOI:10.1021/pr500038k

[14] Livinskaya V A, Barlev N A, Nikiforov A A. Immunoaffinity purification of the functional 20S proteasome from human cells *via* transient overexpression of specific proteasome subunits[J]. Protein Expr Purif, 2014, 97: 37 – 43. DOI:10.1016/j.pep.2014.02.011

[15] Boncela J, Przygodzka P, Papiewska-Pajak I, *et al*. Plasminogen activator inhibitor type 1 interacts with alpha3 subunit of proteasome and modulates its activity[J]. J Biol Chem, 2011, 286(8): 6820 – 6831. DOI:10.1074/jbc.M110.173781

[16] Dumartin L, Whiteman H J, Weeks M E, *et al*. AGR2 is a novel surface antigen that promotes the dissemination of pancreatic cancer cells through regulation of cathepsins B and D[J]. Cancer Res, 2011, 71(22): 7091 – 7102. DOI:10.1158/0008-5472.CAN-11-1367

(收稿:2016-06-18;修回:2016-07-20)

(编辑 汪勤俭)