DOI:10.16016/j.1000-5404.202011204

应用 iTRAQ-MRM-R 语言策略筛选膀胱尿路上皮癌尿液差异蛋白

王琳瑶[1],李常颖[2],李建民[2],李宏杰[1] 063210 河北 唐山,华北理工大学基础医学院,河北省慢性疾病重点实验室[1];300211 天津,天津医科大学第二医院天津市泌尿外科研究所肿瘤免疫室[2]

[**摘要**] **目的** 构建膀胱尿路上皮癌(bladder urothelial carcinoma, BUC)尿液差异蛋白数据集,筛选核心差异蛋白并初步验证。**方法** 于 2015 年 1 月至 2016 年 11 月在天津医科大学第二医院泌尿外科住院病房,采集膀胱上皮癌患者术前尿液标本 78 例,其中男性 55 人,女性 23 人,年龄(68.9±6.6)岁。同时收集 51 例健康志愿者尿液标本用于对照组分析,其中男性 34 人,女性 17 人,年龄(60.6±11.0)岁。采用同位素相对标记和绝对定量技术(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)对 BUC 组混合尿液样本 4 例和对照组混合尿液样本 2 例,共 6 例尿液混合标本进行比较蛋白质组学研究,找出两组间的尿液差异蛋白,选取差异倍数前 20 的差异蛋白进行质谱多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)技术验证;应用 R 语言 cluster profiler 包等进行差异蛋白的京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析、应用 R 语言的 org.Hs.eg.db 包等进行基因本体(Gene ontology, GO)分析,初步选取有意义的差异蛋白,构建 BUC 尿液差异蛋白数据集。应用 R 语言绘制蛋白间相互作用(protein protein interaction,PPI)图,筛选核心差异蛋白。用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)验证核心差异蛋白在尿液中的差异存在。**结果** 通过分析得到 101 个 BUC 尿液差异蛋白,其中 37 个蛋白表达上调,64 个蛋白表达下调。MRM 检测到 10 个差异蛋白;KEGG 分析显示差异蛋白显著富集在其他聚糖降解, 补体和凝血级联这两个代谢通路, 包含 11 个差异蛋白;GO 分析显示差异蛋白主要参与细胞黏附分子结合、羧酸结合、有机酸结合、糖胺聚糖结合、肽链内切酶激活等生物过程,涉及 54 个差异蛋白;三者共同构成 BUC 尿液差异蛋白数据集,包括 69 个蛋白。通过蛋白互作分析筛选出 APOE 和 APOA4 为核心差异蛋白。ELISA 结果显示:BUC 组和对照组的 APOE 平均浓度分别为 0.55 和 0.30 pg/mL。BUC 组和对照组的 APOA4 平均浓度分别为 3.33 和 7.01 ng/mL。与对照组相比,BUC 组尿液中 APOE 和 APOA4 浓度均增高,差异有统计显著性($P<0.05$)。**结论** 应用 iTRAQ-MRM-R 语言策略可以辅助构建 BUC 尿液差异蛋白数据集,并进一步筛选出核心差异蛋白,为 BUC 的诊断及治疗提供新的靶点。

[**关键词**] iTRAQ;MRM;R 语言;KEGG 富集分析;GO 富集分析;蛋白质相互作用

[**中图法分类号**] R319; R341; R737.14 [**文献标志码**] A

Screening urinary differential proteins in bladder urothelial carcinoma based on ITRAQ technique-MRM-R language strategy

WANG Linyao[1], LI Changying[2], LI Jianmin[2], LI Hongjie[1] [1]Hebei Provincial Key Laboratory of Chronic Diseases, College of Basic Medical Sciences, North China University of Science and Technology, Tangshan, Hebei Province, 063000; [2]Department of Tumor Immunology, Tianjin Institute of Urology, Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin, 300211, China

[**Abstract**] **Objective** To construct a urinary differential proteins dataset for bladder urothelial carcinoma (BUC) so as to screen the core differentially expressed proteins (DEPs) and then validate them.

[**基金项目**] 河北省省级科技计划(H2015209164)

[**通信作者**] 李宏杰,E-mail:1980406847@qq.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Methods Preoperative urine samples were collected from 78 hospitalized BUC patients (55 males, 23 females; 68.9±6.6 years old) in the Urology Department of the Second Hospital of Tianjin Medical University from January 2015 to November 2016. At the same time period, urine samples from 51 healthy volunteers were also collected for control group analysis (34 males, 17 females; 60.6±11.0 years old). Using isobaric tags for relative and absolute quantitation (iTRAQ) technology, comparative proteomics study was conducted on a total of 6 mixed urine samples, including 4 cases in the BUC group and 2 cases in the control group, to find out the DEPs between the 2 groups. The top 20 DEPs were selected for multiple reaction monitoring (MRM) verification; Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analysis was carried out with R package, clusterProfiler, and Gene Ontology (GO) enrichment analysis was subsequently performed with org.Hs.eg.db package to preliminarily select the meaningful differential proteins for BUC urinary differential protein dataset. Then the Protein-Protein Interaction (PPI) map was plot using R language to screen the core differential proteins. Furthermore, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was applied to verify the difference of core differential proteins in the urine samples. **Results** A total of 101 BUC urinary DEPs were obtained, of which 37 proteins were up-regulated and 64 down-regulated. MRM detected 10 DEPs. KEGG analysis found that there were 11 DEPs significantly enriched in 2 metabolic pathways, namely other chitosan degradation and complement and blood coagulation cascade. GO analysis displayed that totally 54 DEPs were mainly involved in cell adhesion molecule binding, carboxylic acid binding, organic acid binding, glycosaminoglycan binding, endopeptidase activity and other biological processes. Combining the 3 results, the BUC urinary differential protein dataset was finally established, including 69 proteins in total. By protein interaction analysis, APOE and APOA4 were screened as the core differential proteins. ELISA results showed that the average concentration of APOE was 0.55 pg/mL and 0.30 pg/mL in the BUC group and the control group, respectively, and that of APOA4 was 3.33 ng/mL and 7.01 ng/mL respectively, both with significant increases ($P<0.05$). **Conclusion** The application of iTRAQ-MRM-R language strategy can assist the construction of BUC urinary differential protein dataset, and further screen out the core DEPs, providing a new target for the diagnosis and treatment of BUC.

[**Key words**] isobaric tags for relative and absolute quantitation; multiple reaction monitoring; R language; Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes enrichment analysis; Gene Ontology enrichment analysis; Protein-Protein interaction

Supported by the Project of Science and Technology Plan of Hebei Province (H2015209164). Corresponding author: LI Hongjie, Email: 1980406847@qq.com

膀胱尿路上皮癌(bladderurothelial carcinoma, BUC)是膀胱癌中最常见的类型,具有高发病率、高复发率和高病死率的临床特征,严重威胁着患者的健康与生命。肿瘤标志物监测作为一种简便,无创,快捷的检测手段,广泛应用于肿瘤筛查、诊断、预后评估、疗效监测、复发预测等领域;而比较蛋白质组学研究被认为是发现肿瘤标志物的有效手段[1]。近年来同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantitation,iTRAQ)技术由于其高通量高定量精度的优点,被广泛应用于多种疾病的比较蛋白质组学研究中[2]。本研究采用 iTRAQ 技术对 BUC 患者和对照组的尿液标本进行比较蛋白质组学研究,应用质谱多反应监测(multiple reaction monitoring, MRM)技术对部分差异蛋白进行验证,并使用 R 语言进行生物信息学分析,构建 BUC 尿液差异蛋白数据集。通过蛋白互作网络分析进一步筛选出核心差异蛋白,用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)进行验证,为 BUC 的诊断及治疗提供新的靶点。

1 资料与方法

1.1 标本来源

收集 2015 年 1 月至 2016 年 11 月于天津医科大学第二医院泌尿外科住院病房采集 BUC 患者术前尿液标本 78 例,其中男性 55 人,女性 23 人,年龄(68.9±6.6)岁。取样前患者均未行膀胱镜检、手术、化疗、放疗等有创检查及治疗,排除了肾脏感染、炎症等慢性疾病,临床标本的使用均符合医学伦理要求。收集患者临床资料包括年龄、性别、病理诊断等。同时收集 51 例门诊查体健康人群尿液标本作为对照组,对照组无任何疾病征象或绝对无泌尿系统肿瘤病史及征象,

其中男性 34 人,女性 17 人,年龄(60.6±11.0)岁。两组性别年龄相匹配。

用洁净容器收集受检者晨起中段尿液 20 mL,1 500×*g* 离心 5 min 去掉尿液沉渣,尿液上清保存于-80 ℃冰箱。

1.2 iTRAQ 技术联合质谱分析查找 BUC 尿液差异蛋白

BUC 组每 5 例样本等体积(20 mL)混合,获得 4 例 BUC 组混合样本 T1、T2、T3 和 T4;对照组尿液标本中每 5 例样本随机等体积(20 mL)混合,获得 2 例对照组混合样本 N1 和 N2。尿液蛋白提取后,用 Bradford 法进行蛋白定量;酶解后的肽段用 StrataX 柱进行除盐,真空抽干。用 0.5 mol/L TEAB 溶解肽段样品,并加到对应 ITRAQ 标签试剂中。不同样品肽段选用不同的 ITRAQ 标签;室温静置 2 h。采用岛津 LC-20AB 液相系统进行肽段分离,结合色谱洗脱峰图合并样品得到 20 个组分,然后冷冻抽干。将抽干的肽段样品用 2% 乙腈/0.1%甲酸复溶,20 000×*g* 离心 10 min 后取上清,进样至岛津 LC-20AD 型纳升液相色谱仪中,样品首先进入 trap 柱富集并除盐,随后进入 C18 柱(7.5 mm×150 mm,3.6 μm)进行分离;分离后的肽段直接进入到 ESI 串联质谱仪 Triple TOF 5600 (SCIEX, Framingham, MA, USA)进行分析:一级质谱扫描累积时间为 250 ms,扫描质量范围为 350~1 500 Da;从一级质谱中选择强度超过 150 cp 的前 30 进行二级质谱的扫描,累积时间为 100 ms,扫描质量范围为 350~1 500 Da。利用蛋白质鉴定软件 Mascot 2.3.02 对鉴定出的肽段进行搜索,对比数据库为 SwissProt (Homo_sapieens,2016-11-15),以 Fold change >1.2,且 $P<0.05$ 为筛选条件,最终筛选出两组间显著性差异的蛋白。

1.3 MRM 验证

差异倍数排名前 20 的差异蛋白用于后续 MRM 验证。尿液样品包括对照组(N)5 例, BUC 组(T)10 例。尿液蛋白提取后,经酶解、脱盐等处理,进样至岛津 LC-20AD 型纳升液相色谱仪中,样品首先进入 trap 柱富集并除盐,随后进入 C18 柱(7.5 mm×150 mm,3.6 μm)进行分离;分离后的肽段直接进入到 ESI 串联质谱仪 QTRAP55000 (SCIEX, Framingham, MA, USA)进行分析;质谱仪的参数设置为离子源喷雾电压 2 400 V,喷雾气为 23。以表达差异倍数大于 1.5 倍为筛选条件,结合蛋白功能,选择 16 个目标差异蛋白,进行 MRM 验证;利用 Skyline 软件提取备选目标蛋白在质谱扫描的原始信息进行定量信息分析,利用 MSstats 工具包整合的线性混合模型进行目标蛋白在样品中的相对定量,统计分析后给出蛋白在比较组的比值以及校正 *P* 值(adjusted p-value),在 1.5 倍差异且校正 $P<0.05$ 的条件下认为是显著差异蛋白。

1.4 基于 R 语言的生物信息学分析

应用 R 语言(4.0 版)的 ggplot2 数据包构建火山图来检测蛋白标准化是否合格;应用 R 语言的 cluster profiler 数据包和 enrichplot 数据包等进行京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析,提取前 10 个生物过程及包含的蛋白;应用 R 语言的 org.Hs.eg.db 包等,进行基因本体(Gene ontology,GO)分析,对差异蛋白进行功能注释,选取具有统计学差异的前 20 个生物过程及其所包含的蛋白。

1.5 BUC 尿液差异蛋白数据集的构建及核心差异蛋白筛选

选取 MRM 验证的差异蛋白、KEGG 富集分析及 GO 分析结果中具有统计学差异的生物过程包含的蛋白,共同构建 BUC 尿液差异蛋白数据集。应用 STRINGdb 对数据集中的差异蛋白进行相互作用(Protein Protein Interaction, PPI)分析,选择位于节点数高的蛋白作为核心差异蛋白,用于后续研究。

1.6 ELISA 定量检测核心差异蛋白

尿液样品包括对照组 36 例,BUC 组 48 例。ELISA 检测按照试剂盒说明进行:将倍比稀释的标准品各 100 μL 依次加入一排 7 孔板中,1 孔只加样品稀释液作为对照;尿液标本 1 500 r/min 离心 5 min 去除细胞及沉渣,处理后的标本按 100 μL 每孔加入,每例 3 个复孔;37 ℃反应 90 min,甩干并洗板两次;生物素抗体工作液按每孔 100 μL 依次加入,37 ℃反应 60 min,甩干并洗板 3 次;将准备好的 ABC 工作液按每孔 100 μL 依次加入,37 ℃反应 30 min,甩干并洗板 5 次;每孔依次加入的 TMB 显色 100 μL,37 ℃避光反应 10 min;用酶标仪在 450 nm 测定 *D* 值,通过 *D*(450)值计算出对应的浓度。应用 R 语言的 t.test 函数进行两独立样本 *t* 检验,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 蛋白鉴定结果

在 iTRAQ 定量项目中共有 8 828 条肽段和 1 949 个蛋白被鉴定到,差异蛋白为 101 个,其中在 BUC 组表达上调的蛋白 37 个,表达下调的蛋白 64 个。为了全面展示被测蛋白的组间差异情况,绘制了显著差异蛋白的火山图(图 1),图中绿色点为显著上调蛋白,红色点为显著下调蛋白,蓝色点为无显著变化蛋白。与对照组相比,差异倍数排名前 10 的显著上调和显著下调的差异蛋白见(表 1)。针对这 20 个蛋白进行 MRM 验证分析。

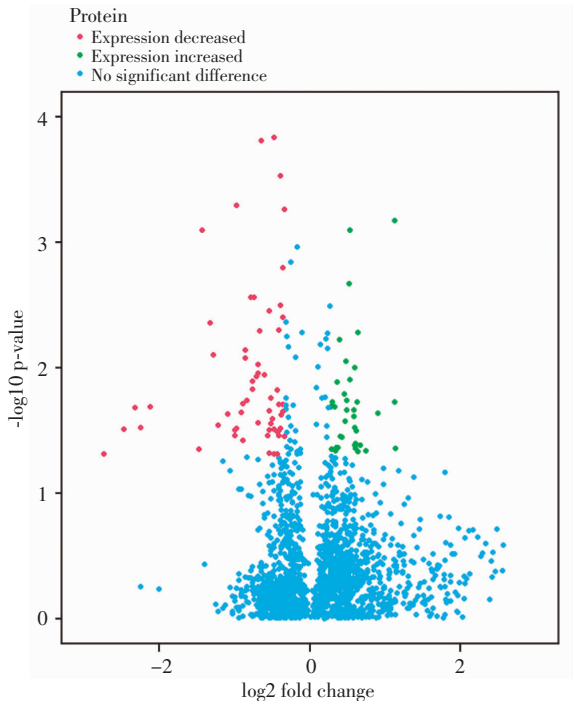


图 1 显著差异蛋白火山图

表 1 BUC 尿液差异蛋白(T/N)

UniProt 编号	蛋白名	浓度变化倍数	UniProt 编号	蛋白名	浓度变化倍数
P01023	A2MG	8.76	O00754	MA2B1	0.05
P15924	DESP	2.2	P01601	KVD16	0.05
P02649	APOE	2.19	O00187	MASP2	0.08
P06753	TPM3	2.18	Q8IV08	PLD3	0.11
P06727	APOA4	1.87	P16278	GLB1	0.15
Q96FW1	OTUB1	1.67	P08195	4F2	0.18
P17213	BPI	1.59	Q9NRX4	PHP14	0.20
Q8TAB3	PCD19	1.56	P48061	SDF1	0.21
P62263	RS14	1.56	Q5JRA6	MIA3	0.23
Q9QC07	POK18	1.55	P98095	FBLN2	0.36

BUC:膀胱尿路上皮癌; T: BUC 组; N:对照组

2.2 MRM 验证分析结果

为了验证 ITRAQ 的定量数据,选择表 1 中的差异蛋白进行 MRM 验证,在 iTRAQ 中检测得到的 20 个差异蛋白中,MRM 成功检测到 10 个,见表 2。表中分列标记有蛋白名称、比较组别、浓度变化以及统计检验的 *P* 值。这 10 个差异蛋白入选 BUC 尿液差异蛋白数据集,进行蛋白相互作用分析。

2.3 差异蛋白的 KEGG 富集分析

与 iTRAQ 和 MRM 着眼于蛋白的浓度变化不同,富集分析旨在通过发掘出现基因富集的生物过程寻找适宜的生物标志物。通过对差异蛋白进行 KEGG 通路分析发现了差异蛋白广泛参与的前 10 个生物过程,结果见图 2,其中 $P<0.05$ 的为差异蛋白显著富集的代谢通路,通路名称为:其他聚糖降解,补体和凝血级联,包含 11 个蛋白,入选 BUC 尿液差异蛋白数据集,留待进行蛋白相互作用分析。

表 2 MRM 验证蛋白

蛋白名	组间比	浓度变化倍数	*P*
A2MG	T/N	4.941	0.03
APOE	T/N	2.632	0.01
APOA4	T/N	2.139	0.01
FBLN2	T/N	0.287	0.00
MIA3	T/N	0.227	0.00
SDF1	T/N	0.216	0.02
4F2	T/N	0.181	0.02
PHP14	T/N	0.176	0.00
PLD3	T/N	0.113	0.00
MASP2	T/N	0.063	0.02

MRM:质谱多反应监测

2.4 差异蛋白的 GO 功能注释

经 GO 分析发现差异蛋白主要参与细胞黏附分子结合、羧酸结合、有机酸结合、糖胺聚糖结合、肽链内切酶激活、腺苷酸环化酶的结合、氨基多糖结合细胞因子、丝氨酸型肽链内切酶抑制剂激活通路等生物过程详见图 3。图中涉及的差异蛋白共 54 个,入选 BUC 尿液差异蛋白数据集,留待进行蛋白相互作用分析。

2.5 BUC 尿液差异蛋白数据集及核心差异蛋白

选取 MRM 验证中出现 10 个差异蛋白、在 KEGG 富集分析结果中出现的 11 个差异蛋白和 GO 分析中出现的 54 个差异蛋白,共同构建由 69 个(6 个重复蛋白)差异蛋白构成的 BUC 尿液差异蛋白数据集。将 69 个差异蛋白输入 STRING 数据库,进行蛋白相互作用分析。结果(图 4)所示:APOE 与 10 个蛋白有关联,APOA4 与 6 个蛋白有关联,以上 2 蛋白为与其他蛋白关联最多的蛋白,因此我们选择 APOE 和 APOA4 作为核心差异蛋白进行 ELISA 验证。

2.6 ELISA 定量检测 BUC 尿液核心差异蛋白

我们通过 ELISA 对两组样本中核心差异蛋白—— APOE 和 APOA4 的含量进行了进一步验证分析。与对照组相比,BUC 组尿液中 APOE 和 APOA4 浓度均增高。经两独立样本 *t* 检验,差异有显著性($P<0.05$,表 3)。说明 APOE 和 APOA4 的浓度在 BUC 病患和健全人群的尿液中存在差异。

表 3 各组尿液中 APOE 和 APOA4 浓度

组别	*n*	APOE(pg/mL)	APOA4 (ng/mL)
对照组	36	0.30±0.10	3.33±1.20
BUC 组	48	0.55±0.12[a]	7.01±1.71[a]

a:$P<0.05$,与对照组比较

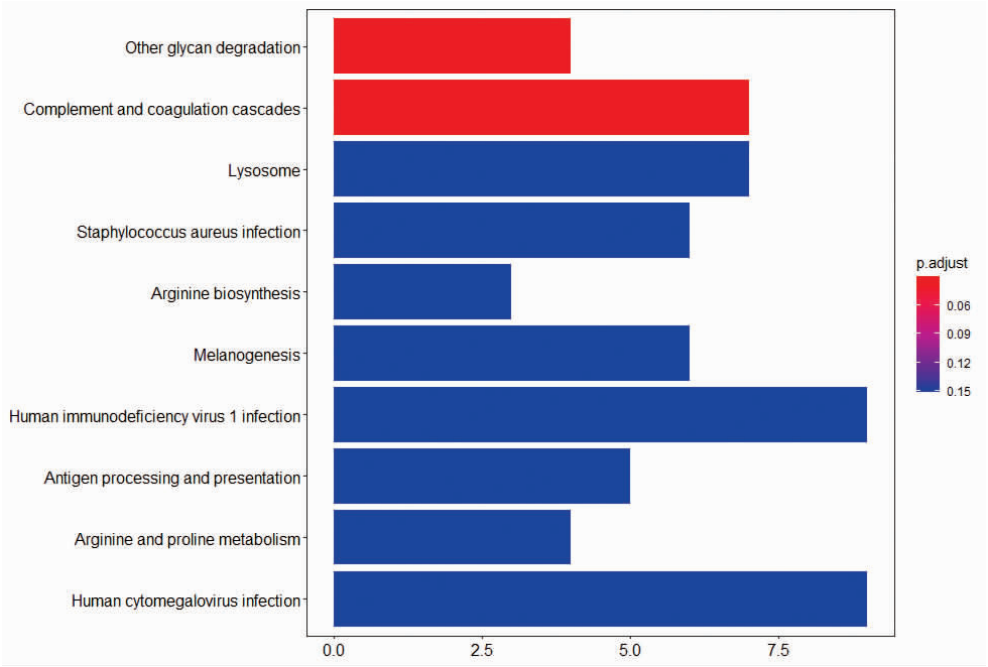


图 2　差异蛋白的 KEGG 富集分析　（KEGG：京都基因与基因组百科全书）

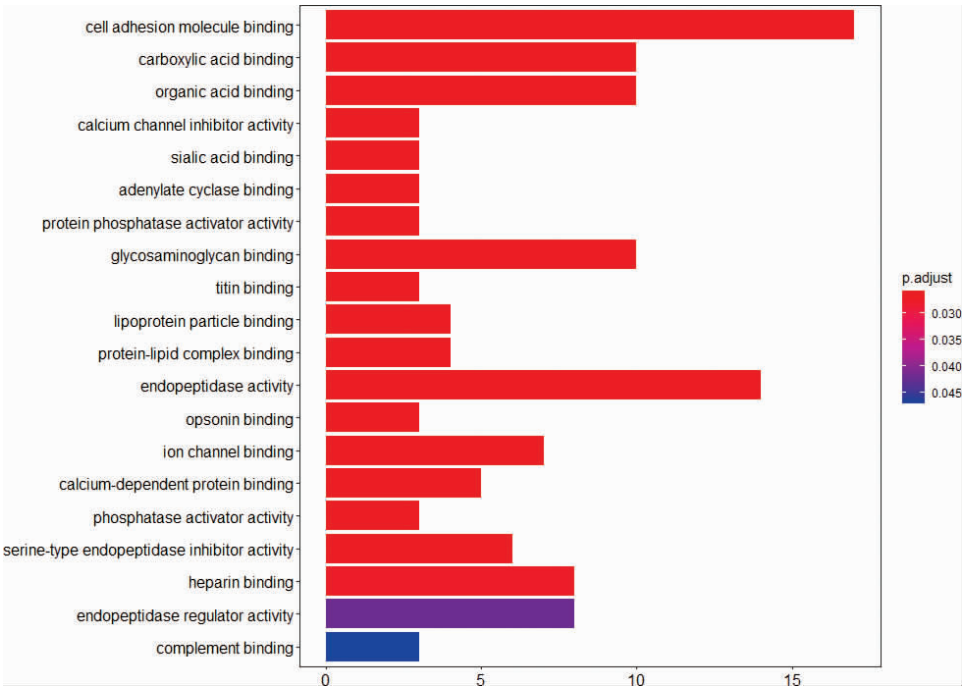


图 3　差异蛋白的 GO 功能注释　（GO：基因本体论）

3　讨论

本研究采用 ITRAQ-MRM-R 语言策略，构建了由 69 个差异蛋白构成的 BUC 尿液差异蛋白数据集，通过 PPI 分析得到 APOE 以及 APOA4 这两个核心差异蛋白，并采用 ELISA 验证了 APOE 和 APOA4 均在 BUC 组尿液中浓度显著增高。

MRM 技术是一种基于已知信息或假定信息进行质谱信号采集的技术，具有灵敏度高、重现性好、准确率高和通量高等优点。对于 iTRAQ 获得的大量结果，用 MRM 进行验证，更能满足蛋白质组学的研究需求。R 语言的 enrichplot，org. Hs. eg. db，stringdb 等相关生

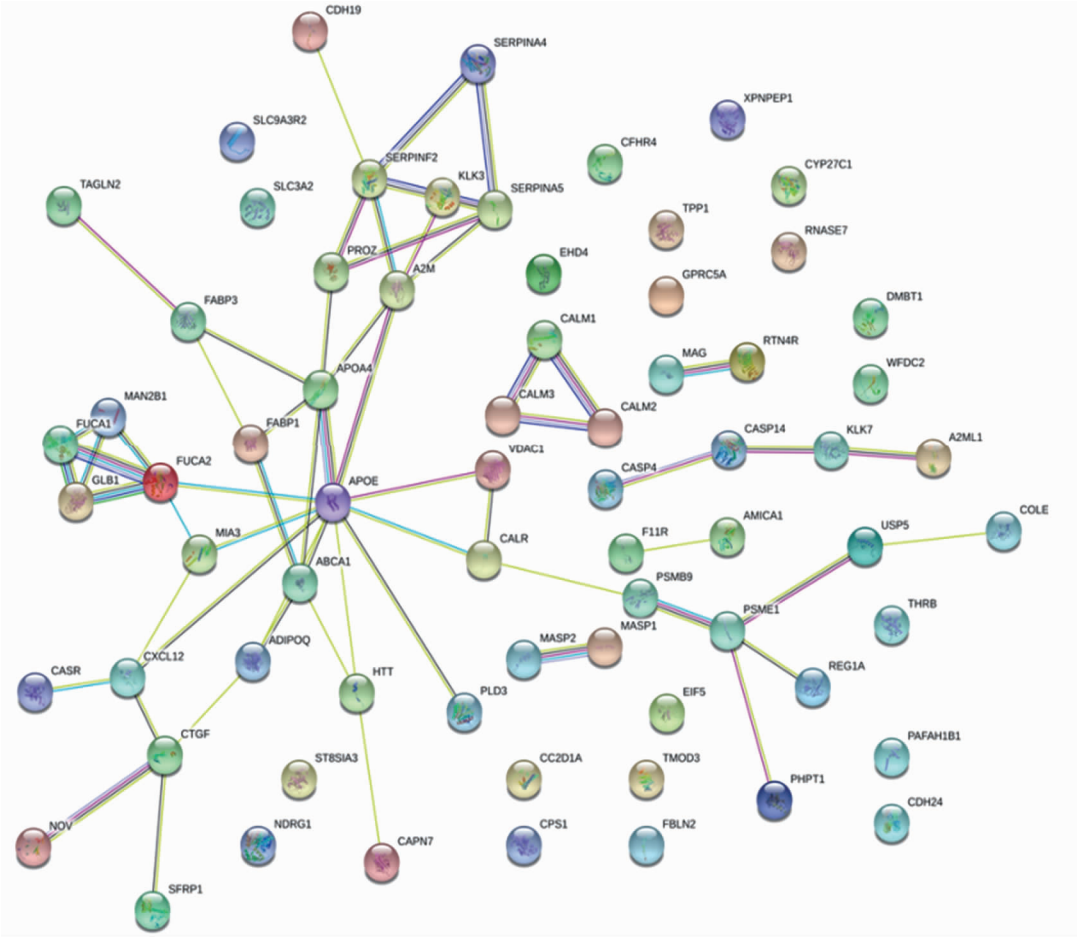


图 4　蛋白质交互作用图

物信息分析包可以对 iTRAQ 结果进行差异蛋白富集分析、KEGG 通路分析、GO 分析、蛋白间相互作用分析等。ITRAQ-MRM-R 语言三者结合有效的筛选出 BUC 尿液差异蛋白。

本研究对差异蛋白进行 KEGG 通路分析发现 BUC 差异蛋白显著富集于其他聚糖降解，补体和凝血级联；GO 分析发现差异蛋白主要参与细胞黏附分子结合、羧酸结合、有机酸结合、糖胺聚糖结合、肽链内切酶激活、腺苷酸环化酶的结合、氨基多糖结合细胞因子、丝氨酸型肽链内切酶抑制剂激活通路等生物过程。

富集分析中提示的生物通路与癌症的直接或间接关系尚不明确。但若干通路与癌症的发生、发展过程存在的潜在联系可见于在现存文献。例如 LI 等[3]报道在关于胆管癌生物标志物的研究中，补体与凝血过程同样出现在 pathway 分析的结果中。CARAYON 等[4]在对甲状腺癌的研究中提示腺苷酸环化酶的结合功能与甲状腺癌分型可能存在关联。MURAMATSU 等[5]指出在多种恶性肿瘤患者的血清、血浆中，都能观察到氨基多糖结合细胞因子的增加。SANDRA 等[6]在关于恶性胰岛素肿瘤的生物标志物研究中发现丝氨酸型肽链内切酶抑制剂激活通路出现富集等等。

APOE 基因涉及多种生物过程，其中最主要的功能是参与脂质、胆固醇的代谢和转运[7]。过往的研究发现其与阿尔兹海默症、心血管疾病、脑部炎症、精神分裂症[7-9]等多种疾患存在关联。已有研究发现胃癌、非小细胞肺癌、直肠癌等癌症，都与 APOE 基因表达存在关联[10-12]。APOE 作为 BUC 的尿液差异表达蛋白被检测到的原因，可能源自其对非特异性免疫的抑制作用[13-14]。提示 BUC 的发生、发展过程中可能存在 APOE 引导的非特异性免疫抑制的发生。

APOA4 编码构成淋巴细胞和血浆中乳糜微粒的主要成分[15]。现存的研究结果提示其与糖尿病肾病、阿尔兹海默症[16-17]等疾病存在关联。此外，APOA4 曾同样作为 BUC 的生物标志物，在 SOUKUP 等[18]的研究中被发现，这与本次研究的成果相呼应。

受研究条件局限，本次研究的样本来源较为单一，所有标本收集自天津医科大学第二医院泌尿外科住院部。这使得本次研究的观察范围局限于居住于华北地

区的东亚细亚人种的中老年住院病患。因 iTRAQ 检测费用较高,用于 iTRAQ 的样本量较小,为此我们采用混合样本的方法减小组内样本间的差异,并在后续 MRM 验证及 ELISA 验证过程中逐渐增大样本量,取得了可信的结果。本研究结果提示 APOE 和 APOA4 具有 BUC 诊断的潜在价值,在今后的研究中,我们将会尝试扩大样本量和样本来源,增加样本的年龄、人种、居住地等特征的异质性,使其更具代表性;或通过综述性研究,对同类小样本研究结果进行总结归纳,得出更可靠的结论。

参考文献:

[1] 王月坤, 刘芃昊, 王裕, 等. 单细胞测序及其与未来脑恶性肿瘤的诊疗[J]. 协和医学杂志, 2020, 11(5): 606-614. DOI: 10.3969/j.issn.1674-9081.2020.05.018.
WANG Y K, LIU P H, WANG Y, *et al*. Single-cell sequencing and its prospect in the management of brain malignant tumor[J]. Med J Peking UMCH, 2020, 11(5): 606-614. DOI: 10.3969/j.issn.1674-9081.2020.05.018.

[2] WIESE S, REIDEGELD K A, MEYER H E, *et al*. Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research[J]. Proteomics, 2007, 7(3): 340-350. DOI: 10.1002/pmic.200600422.

[3] LI H Y, LONG J Y, XIE F C, *et al*. Transcriptomic analysis and identification of prognostic biomarkers in cholangiocarcinoma[J]. Oncol Rep, 2019, 42(5): 1833-1842. DOI: 10.3892/or.2019.7318.

[4] CARAYON P, THOMAS-MORVAN C, CASTANAS E, *et al*. Human thyroid cancer: membrane thyrotropin binding and adenylate cyclase activity[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1980, 51(4): 915-920. DOI: 10.1210/jcem-51-4-915.

[5] MURAMATSU T, MURAMATSU H. Glycosaminoglycan-binding cytokines as tumormarkers[J]. Proteomics, 2008, 8(16): 3350-3359. DOI: 10.1002/pmic.200800042.

[6] DE SÁ S V, CORRÊA-GIANNELLA M L, MACHADO M C, *et al*. Serpin peptidase inhibitor clade A member 1 as a potential marker for malignancy in insulinomas[J]. Clin Cancer Res, 2007, 13(18 Pt 1): 5322-5330. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1477.

[7] YIN Y M, WANG Z. ApoE and neurodegenerative diseases in aging[J]. Adv Exp Med Biol, 2018; 1086: 77-92. DOI: 10.1007/978-981-13-1117-8_5.

[8] FORERO D A, LOPEZ S, GONZALEZ G Y, *et al*. APOE gene and neuropsychiatric disorders and endophenotypes: A comprehensive review[J]. Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet, 2018, 177(2): 126-142. DOI: 10.1002/ajmg.b.32516.

[9] REBECK G W. The role of APOE on lipid homeostasis and inflammation in normalbrains[J]. J Lipid Res, 2017, 58(8): 1493-1499. DOI: 10.1194/jlr.r075408.

[10] SAKASHITA K, TANAKA F, ZHANG X, *et al*. Clinical significance of ApoE expression in human gastric cancer[J]. Oncol Rep, 2008, 20(6): 1313-1319.

[11] AN H J, KOH H M, SONG D H. Apolipoprotein E is a predictive marker for assessing non-small cell lung cancer patients with lymph node metastasis[J]. Pathol Res Pract, 2019, 215(10): 152607. DOI: 10.1016/j.prp.2019.152607.

[12] SLATTERY M L, SWEENEY C, MURTAUGH M, *et al*. Associations between apoE genotype and colon and rectal cancer[J]. Carcinogenesis, 2005, 26(8): 1422-1429. DOI: 10.1093/carcin/bgi088.

[13] ZHENG P M, LUO Q, WANG W W, *et al*. Tumor-associated macrophages-derived exosomes promote the migration of gastric cancer cells by transfer of functional apolipoprotein E[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(4): 434. DOI: 10.1038/s41419-018-0465-5.

[14] TAVAZOIE M F, POLLACK I, TANQUECO R, *et al*. LXR/ApoE activation restricts innate immune suppression in cancer[J]. Cell, 2018, 172(4): 825-840.e18. DOI: 10.1016/j.cell.2017.12.026.

[15] LAMINA C, FRIEDEL S, COASSIN S, *et al*. A genome-wide association meta-analysis on apolipoprotein A-IV concentrations[J]. Hum Mol Genet, 2016, 25(16): 3635-3646. DOI: 10.1093/hmg/ddw211.

[16] CHENG C W, CHANG CC, CHEN H W, *et al*. Serum ApoA4 levels predicted the progression of renal impairment in T2DM[J]. Eur J Clin Invest, 2018, 48(6): e12937. DOI: 10.1111/eci.12937.

[17] LIN Q, CAO Y P, GAO J. Decreased expression of the APOA1-APOC3-APOA4 gene cluster is associated with risk of Alzheimer's disease[J]. Drug Des Devel Ther, 2015, 9: 5421-5431. DOI: 10.2147/DDDT.S89279.

[18] SOUKUP V, CAPOUN O, PESL M, *et al*. The significance of calprotectin, CD147, APOA4 and DJ-1 in non-invasive detection of urinary bladder carcinoma[J]. Neoplasma, 2019, 66(6): 1019-1023. DOI: 10.4149/neo_2019_190124N74.

(**收稿**:2020-11-23;**修回**:2021-01-21)

(编辑 张艺霖)