

特约综述

实验室成立于2007年7月,于2008年底获批组建厦门市代谢性疾病重点实验室。主要针对糖尿病、肥胖症、生殖系统疾病、乳腺癌等重大疾病,从细胞信号调控的角度,研究疾病的分子机理,寻找原创性治疗靶点,研发新型靶向药物。已发现*SHP2*、*GAB2*、*LMO4*、*AGR2*等多个疾病的关键调控基因。实验室已建立良好的研究技术平台,具有成熟的分子生物学、细胞生物学、转基因动物、疾病动物模型的实验技术体系和灵敏可靠的药物筛选系统以及较好的生物信息学技术。

<http://pharm.xmu.edu.cn/newsdetail.asp?id=1297>

AGR2: 一个新的癌症诊断标记

魏龙刚 邓鸣涛 赵一楠 吕忠显*

(厦门大学药学院, 厦门 361005)

摘要 AGR2(anterior gradient-2)是一种分泌蛋白,广泛存在于前列腺、乳腺、肺和胰腺等腺体组织,并在这些腺体的肿瘤组织过量表达,与肿瘤细胞的存活、生长和转移相关。临床上,AGR2的表达与乳腺癌、前列腺癌、胰腺癌等癌症的发展和预后相关,被认为是一个很有前途的早期诊断和判定预后的标志性基因。该文就目前AGR2的研究现状,尤其是肿瘤相关的功能、机制和临床调查上的最新研究进展加以综述。

关键词 AGR2; 腺癌; 生物标记

AGR2: A New Biomarker of Cancer Diagnosis

Wei Longgang, Deng Mingtao, Zhao Yanan, Lü Zhongxian*

(School of Pharmaceutical Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract AGR2 is a secreted protein and widely found in the prostate, breast, lung and pancreatic gland tissue. It has excessive expression in the tumor tissue of these glands and regulates tumor cell survival, growth and metastasis. Clinical expression of AGR2 in breast cancer, prostate cancer and pancreatic cancer is relative to the progress of tumor development. Thus, AGR2 is considered to be a promising biomarker for early diagnosis and prognosis. In this paper, we reviewed the current research status of AGR2, especially tumor related functions, clinical investigation and mechanisms.

Key words AGR2; adenocarcinoma; biomarker

科技部国家重大基础研究计划项目(批准号: 2010CB945004)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0592-2187227, E-mail: zhongxian@xmu.edu.cn

This work was supported by the National Basic Research Program of China (Grant No.2010CB945004)

*Corresponding author. Tel: +86-592-2187227, E-mail: zhongxian@xmu.edu.cn

网络出版时间: 2013-11-25 10:15 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20131125.1015.002.html>

癌症严重威胁人类的健康和生命,影响社会和经济的发展。随着对癌症的不断研究,有许多癌基因和抑癌基因被发现,并被证明与肿瘤的发展和恶变有关。1998年,美国斯坦福大学的Devon A.Thomson和Ronald J.Weigel使用抑制性消杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)从乳腺癌细胞系MCF7的cDNA文库中筛选出非洲爪蟾*xAG2(Xenopus anterior gradient-2)*的同源基因,命名为anterior gradient-2(*AGR2*)^[1]。*AGR2*只表达于雌激素受体阳性的乳腺癌细胞株^[1-2],而不表达于雌激素受体阴性的乳腺癌细胞株的特性,使它一发现就受到很大关注。随后展开的大量研究显示,*AGR2*过表达于半数以上的前列腺癌^[3-4]、乳腺癌^[2,5-7]、胰腺癌^[8-9]、食道癌^[10-12]等病例中,与肿瘤的发展阶段和病理特性具有一定的相关性,可能参与肿瘤细胞的转移、存活、浸润等过程,表明*AGR2*可能是一个新的癌症关键调控和标记基因。*AGR2*对肿瘤的调控作用和机制,是目前肿瘤研究领域一个重要的热点^[13-14]。本文着重就*AGR2*与癌症的发生发展及临床病理关系的研究进展作一综述。

1 *AGR2*蛋白结构和功能形式

人类*AGR2*基因定位于染色体7p21.3,有两个转录产物,全长分别是0.9 Kb和1.7 Kb,链短的含量更丰富,链长的含量则非常低,以前分别称之为*hAG-2*和*hAG-3*,目前主要研究的*AGR2*是0.9 Kb的*hAG-2*,其翻译起始位点是KOZAK(GCCATGG)序列,含有8个外显子和7个内含子,由175个氨基酸组成^[1]。其N-端含有可以切除的分泌信号序列,切割位点位于Ala20/Lys21^[2]。C-末端的10个氨基酸可能对增强细胞存活有重要的作用,因为删除*AGR2*蛋白C-末端10个氨基酸可以降低对肺癌细胞系H1299菌落形成的增强效应^[11]。另外,C-端的内质网回归序列可能在细胞内运输中具有重要的作用^[15]。NMR结构显示,*AGR2*在N-端通过硫氧还蛋白褶皱形成一个非结构化的区域。*AGR2*也能形成稳定的二聚体结构。非结构化的区域主要是负责*AGR2*促进细胞黏附能力,而二聚作用可能是在内质网应激(ER)中具有关键作用,可通过BiP/GRP78介导ER诱导的细胞死亡,也与催化氧化还原活性相关^[16]。

在乳腺癌中,*AGR2*与雌激素受体共存在,受雌激素诱导而表达,是一个雌激素的靶基因,启动子上

具有雌激素受体反应元件^[17-18]。而在前列腺癌细胞,*AGR2*蛋白表达不仅可以被雄激素睾酮、乙烯雌酚、17-beta雌激素和孕酮轻微诱导,也可以强烈地被合成雄激素R1881、米勃酮所诱导,但不能被糖皮质激素诱导^[4]。但随后的研究发现,*AGR2*表达并不完全依赖性激素,其他因素也能诱导它的表达。雌激素受体阴性细胞系MDA-MB-231在无血清和低氧条件下培养24 h后,*AGR2*的表达量增加了8倍,同样的情况也出现在雌激素受体阴性细胞系BT20中^[19]。UV和放线菌素D处理来模拟DNA损伤时,*AGR2*的表达可抑制肿瘤抑制蛋白P53,增加细胞的存活和形成克隆的能力^[11]。甚至环境毒素2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)刺激肝癌细胞系时,也能增加*AGR2*的转录表达,从而抑制P53的活性^[20]。因此,*AGR2*的表达可受雌激素、雄激素等的诱导,同时也可受各种极端条件的刺激。而后者作为细胞应对极端刺激的应答,在*AGR2*调控肿瘤发生发展中可能担当更重要的角色。

*AGR2*被认为是一个分泌蛋白。Liu等^[17]用免疫细胞化学染色方法发现,人乳腺癌标本中*AGR2*蛋白以颗粒的形式分布在细胞外。前列腺癌细胞被雄激素刺激后,在培养液中可检测到*AGR2*^[4]。而乳腺癌细胞MDA-MB-231正常状态下不表达*AGR2*,但在低氧或低血清培养时,却能表达并分泌*AGR2*^[19]。Ramachandran等^[8]证明,*AGR2*在胰腺肿瘤细胞的条件培养基里存在,并且*AGR2*沉默之后会降低胰腺癌细胞的增殖、浸润,这些提示*AGR2*可能是一种具有生物活性的分泌蛋白,但分泌形式的*AGR2*的功能和机制还缺乏研究。

目前的研究表明,*AGR2*除了分泌形式外,还有其他的功能形式。2005年,Persson等^[21]利用蛋白质组学分析,推测*AGR2*是蛋白二硫化物异构酶PDI家族成员。PDI家族的蛋白质具有活性基序CXXC或CXXS,一般含有1~4个这样的基序,主要定位于内质网,催化二硫键的形成和异构化,从而稳定蛋白质,还可以作为分子伴侣抑制蛋白聚集^[22]。*AGR2*蛋白C-端含有内质网回归信号序列KTEL,可在内质网内积聚。所以推测*AGR2*在生理压力条件下可能被大量诱导表达,清除在压力时期细胞内错误折叠的蛋白质^[8]。但*AGR2*并不一定都存在于内质网,在内质网外的细胞浆里也发现它的存在^[23];在乳腺癌、前列腺癌等组织的*AGR2*免疫组化检测中,*AGR2*弥

散存在于整个细胞质^[17]; AGR2也能定位于质膜的外表面^[24]。免疫荧光染色和流式细胞技术证实, 在非通透性且表达AGR2的胰腺癌细胞系PaTu8988、FA6、CFPAC1中, AGR2存在于质膜的外表面, 并且在乳腺癌MCF7细胞系中也有相似的分布^[24]; 另外, AGR2在Barrett's上皮和卵巢囊肿中, 呈现异质性和极性分布, 也表明一部分AGR2可以定位在质膜上^[11]; Western blot检测发现, 在SU.86.86、MPanc-96、PaTu 8988s和CFPAC1胰腺癌细胞系的培养基上清中有AGR2的存在, 但在同样表达AGR2的FA6和BxPC3胰腺癌细胞系中却没有检测到, 因此推测AGR2有可能不是主动分泌到细胞外, 而只是从细胞表面脱落^[8,24]。AGR2的不同功能形式, 与它在生理或者病理中的角色的关系, 还有待于深入的研究。

2 AGR2的功能及调控机制

AGR2蛋白在一系列生物系统中发挥作用, 包括ER应激^[25-27]、肢再生、杯状细胞末端分化、炎症^[28]等, 特别是在肿瘤耐药性、生长、转移、浸润等方面有重要作用(图1)。所以AGR2的功能及其在信号转导过程中如何发挥作用, 并与其他信号通路和蛋白质因子相互联系是一个引人入胜的问题。

关于AGR2对肿瘤的调控作用, 将在后面详细论述, 这里主要介绍AGR2对发育的影响。在非洲爪蟾发育过程中, AGR2的同源蛋白XAG-2诱导黏膜

的分化和前部神经标记基因的表达^[29]; 而在蝶螈中, AGR2的同源蛋白nAG可以促进肢体再生, 此过程涉及干细胞的去分化和重分化^[30]; 在斑马鱼中, AGR2只表达于肠道杯状细胞, 参与斑马鱼胚胎肠道杯状细胞的末端分化, 即杯状细胞的成熟^[31]。高等动物中, AGR2也促进腺体器官的分化成熟。AGR2表达于鼠类胃的颈黏液细胞, 促进多个细胞系的分化, 而抑制胃干细胞或早期祖细胞的增殖; 敲除AGR2后, 导致胃颈黏液细胞增多, 终端分化细胞减少^[32]; 在小鼠肠组织中, AGR2也表现出同样的作用^[26]。在乳腺中, AGR2也促进乳腺小叶的分化和乳汁的产生^[33]。这些结果表明, AGR2可能参与保持表皮细胞分化和增殖的平衡。

尽管对AGR2的功能认识越来越多, 但对于AGR2的作用机制仍然所知甚少。如前面所述, AGR2属于PDI家族蛋白, 可能积聚在内质网, 调控折叠蛋白^[21]; 受UV和放线菌素D等的诱导, 抑制P53的磷酸化^[11]等。由于目前对AGR2作用机制的认识多是在癌症相关的研究中得到, 随后本文将在AGR2对癌症的调控中作以论述。

3 AGR2与癌症

3.1 AGR2与乳腺癌

AGR2是在比较雌激素受体阳性与阴性细胞蛋白的差异中发现, 只表达于在雌激素受体阳性细

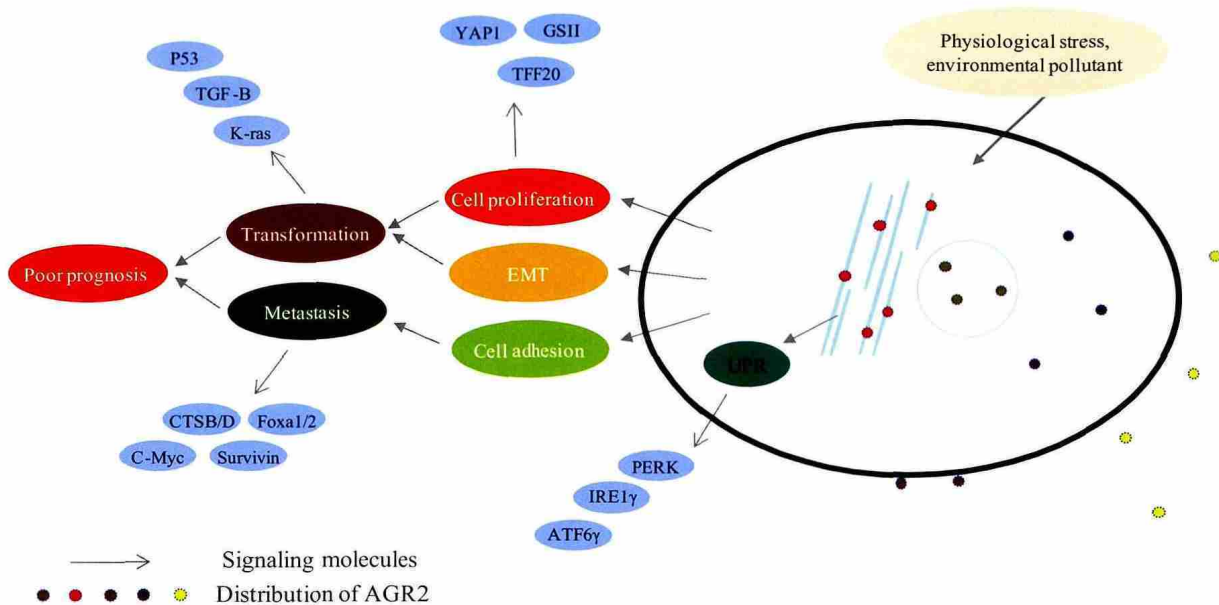


图1 AGR2在肿瘤细胞中的作用及分布

Fig.1 The function and distribution of AGR2 in cancer cells

胞系,如MCF7、T-47D、ZR-75-1、BT-474和MDA-MB-361等^[1,21]。随后,在临床病例的研究中,也证实AGR2的表达与雌激素受体呈正相关^[5-7]。而且乳腺细胞系中,AGR2受雌激素刺激而表达^[17]。在AGR2启动子区,也具有雌激素受体反应元件(ERE)^[18]。因此,AGR2在乳腺癌中的角色引起了人们巨大兴趣,推测它可能介导雌激素诱导乳腺癌的发生和生长,是乳腺癌的一个具有潜力的诊断标记^[14]。

随后,多个研究组分析了AGR2在乳腺癌病理组织中的表达与临床病理特征的关系。Fritzsche等^[6]在蛋白和mRNA水平上调查了AGR2在155例乳腺癌样本中的表达,证实AGR2多表达于雌激素受体阳性肿瘤,并与肿瘤低分级、小肿瘤、淋巴结阴性等相关;AGR2表达预示乳腺癌病人的预后良好,存活时间长;而且,具体到肿瘤低分级、小肿瘤、淋巴结阴性的肿瘤,AGR2的表达也与良好的预后相关^[6]。但同时发表的另一个研究调查了351例乳腺癌样本,却得到了相反的结果^[5]。除了发现AGR2阳性染色与雌激素受体、低肿瘤等级的关系具有统计学意义外,AGR2与其他临床病理指标都没有相关性,并不能知道病人的预后;但当单独考虑雌激素受体阳性的样本时,AGR2表达却与病人的存活时间具有很强的负相关性,即随着其蛋白水平的升高,病人的存活时间则逐渐变短;然而若单独考虑雌激素受体阴性的样本则没有此种关系;而且合并考虑雌激素受体和其他指标时,AGR2在小肿瘤、低分级肿瘤中,都与较差的预后相关^[5]。造成这两个差别很大的研究结果的原因有很多,其中一个主要的原因是研究所选用的样本都是经过治疗后的肿瘤,病人的预后都有改变;而且内分泌药物或者放射等治疗都可能影响AGR2的表达,干扰最后的分析结果。为此,Barraclough等^[7]选择了315例未经任何治疗的乳腺癌样本,证实AGR2的表达不仅与雌激素受体相关,还与孕激素受体、骨质素、S100P、S1004A等相关,而这些蛋白都与肿瘤转移密切相关;追踪患者20年内的生存情况,发现病人的存活时间与AGR2表达程度有很强的负相关,AGR2表达越多病人的生存时间越短;不表达AGR2的病人有96%能生存20年,而只有26%的AGR2表达病人能幸存这么长时间^[7]。这些结果表明,AGR2可能作为一个肿瘤转移的相关因子,与病人的差预后相关。

其实利用细胞系的研究结果,也支持AGR2可

能参与肿瘤迁移扩散等恶性行为。在Liu等^[17]转染AGR2表达载体到大鼠乳腺上皮细胞Rama37,而后移植到同源宿主的乳腺脂肪垫中,发现AGR2并不影响肿瘤的产生和生长,却促进转移到肺的比率^[17]。体外细胞系实验也证实,AGR2转染Rama37细胞后使其贴壁黏附率升高,但对其生长无影响^[17];这些提示,AGR2调控乳腺组织癌细胞的转移而非肿瘤的发生。而且AGR2的调控可能是以分泌蛋白的形式进行的,因为体外将删除信号肽的重组AGR2加入培养基中发现,Rama37和转入空载体的Rama37的黏附性增强^[17]。但令人不解的是,转染AGR2的Rama37细胞,其黏附性不再受外源重组AGR2的影响^[17]。Vanderlaag等^[18]用siRNA技术将乳腺癌细胞系中的AGR2敲除,不仅抑制了细胞的生长,也能导致细胞的死亡,在ER阳性细胞系中降低了survivin和c-Myc的表达,而survivin和c-Myc都与乳腺癌的转移、侵袭相关。Fletcher等^[2]用酵母双杂交的方法找到了与AGR2相互作用的两个蛋白质: GPI锚定C4.4a蛋白和细胞外DAG-1蛋白。而这两个蛋白对肿瘤转移有重要的促进作用,如GPI锚定C4.4a蛋白与其配体层黏连蛋白1和5结合,与半乳糖凝集素3联系在一起促进细胞转移。因此,AGR2可能通过受体黏附和功能性调节来促进肿瘤转移,与肿瘤的恶性特征有关^[2]。

目前,AGR2已被公认为是一个癌症转移诱导蛋白,并作为转移标志物应用于其他研究中。除此之外,AGR2促使肿瘤的恶性转化,还表现在其他方面,如增加药物耐受。尽管AGR2的表达能被雌激素受体诱导,但反过来,AGR2蛋白却能导致雌激素受体 α 水平降低^[18]。而且,Tamoxifen等治疗药物不能降低AGR2表达,反而促使其水平升高,其中PDPK1-AKT通路可能参与其中^[34];在用Tamoxifen治疗的乳腺癌病例中也出现AGR2表达较多的现象^[35]。用芳香化酶抑制剂处理细胞时,AGR2水平也被显著提高^[36]。在其他非药物治疗中,射线、化学药物等应激都可能导致AGR2激活^[7]。Zweitzig等^[19]的研究表明,在生理压力条件下,AGR2的诱导是可以独立于雌激素受体的。例如,雌激素受体阴性细胞系BT20在无血清和低氧情况下,AGR2的表达多达正常情况的8倍;而且缺氧和缺血条件下,MDA-MB-231细胞系中在雌激素受体没有被诱导的情况下,AGR2同样被诱导表达,并同时伴随着TFF3/ITF和SPP1的显著升高^[19]。另外,利用肺癌细胞系的研究也发现,紫外线

照射或放线菌素D处理时, 组成型过表达的AGR2抑制了P53的活化, 从而阻止了细胞的凋亡, 增强了它们的存活能力^[11]。Maslon等^[37]发现, 在乳腺癌细胞中AGR2能结合Reptin, 可通过其104-111位氨基酸残基形成一个分散的八肽loop结构域与Reptin相互作用, 形成稳定的复合物, 以此来调节Reptin的ATPase活性、解旋酶功能或是telomerase/Pontin结合活性, 提示AGR2也可能影响端粒的长度。

3.2 AGR2与前列腺癌

AGR2也被认为是前列腺癌的标记蛋白^[13,38]。它特定地表达在上皮分泌细胞, 包括前列黏腺^[4]。雄激素和雌激素都能刺激AGR2的表达, 其中介导这些激素信号的cAMP、PKA、PKC皆能诱导AGR2的表达。它们的刺激都具有剂量和时间依赖性^[4,39]。AGR2对前列腺癌的调控也主要与细胞的存活、转移等恶性特征有关。

AGR2在前列腺癌细胞中的表达与Cyclin D1和p-Rb相关, 在LNCaP和DU145细胞系过表达时促进细胞增殖, 而在PC3、LNCaP和DU145细胞内敲除时, 可导致细胞衰老, 即不可逆的细胞周期阻滞和增殖能力的丧失^[40]。敲除AGR2后G₀/G₁期细胞积累, 衰老相关β-半乳糖苷酶(SA-β-Gal)染色发现阳性细胞增多, 这是哺乳类动物细胞典型的衰老特征。然而衰老的具体机制在LNCaP细胞、PC-3细胞和DU145三种细胞中略有差异。AGR2敲除后, LNCaP细胞(P53 wild-type)中P53、P21^{CIP1}表达水平升高, ERK信号通路失活; PC-3细胞(P53 null)中P21^{CIP1}表达水平上升, PI3K/Akt通路受到抑制; DU145(P53 mutant)细胞中P27^{KIP1}、PTEN被上调, PI3K/Akt通路受抑制。AGR2敲除后, Cyclin D1和p-Rb的表达水平以时间依赖的方式逐步减少, 仅有DU145细胞中没有p-Rb表达。P53-P21^{CIP1}、P16^{INK4a}-Rb、PTEN-P27^{KIP1}是CDK的抑制因子, 已被证明与细胞衰老有关^[40]。

利用iTRAQ-mass spectrometry发现, 在多西紫杉醇(Docetaxel)耐受的前列腺癌细胞系PC3-Rx中, AGR2水平下降; 而用干扰RNA敲除PC3细胞内的AGR2, 可导致PC3细胞对多西紫杉醇反应性降低^[41]。关于AGR2促进转移的能力, Foxa1和Foxa2可能是两个促进的因子, 它们都能刺激AGR2的表达而促进癌细胞转移; 而ErbB3结合蛋白1(EBP1)可能是一个抑制因子, 它能拮抗Foxa1和Foxa2的诱导, 抑制AGR2的表达, 减弱细胞转移的能力^[42]。

Zhang等^[3]用实时逆转录PCR和免疫组织化学染色发现, 相比于良性组织, AGR2高表达于大部分的前列腺癌组织; 利用Gleason评分或Kaplan-Meier生存分析, 都表明AGR2表达升高与病人的预后不良相关, 病人的存活时间较短; 另外, AGR2的表达与前列腺特异性抗原(PSA)相关, 但与雄激素受体不相关^[3]。Maresh等^[23]进一步利用蛋白芯片发现, AGR2在良性前列腺肿瘤中表达较高, 而在恶性的前列腺癌中表达相对降低; 对个体而言, AGR2在高分级肿瘤中的表达降低, 预示着较高的复发率^[23]。如果结合其他的标记蛋白, 可能提高AGR2对前列腺癌的诊断效率。最近, Ho等^[43]发现, 结合AGR2和CD10的组合表达模式, 可将原发性前列腺癌分为四个临床表型: AGR2(高)CD10(低)的病人无复发生存的时间最长, 是AGR2(低)CD10(高)病人的9倍; AGR2(高)CD10(高)和AGR2(低)CD10(低)的病人生存时间介于两者之间^[43]。尽管AGR2(低)CD10(高)多见于高肿瘤级别, 但在扩散到骨和其他软组织的肿瘤细胞中确实存在AGR2多且CD10少的现象^[43]。这些结果提示, AGR2在前列腺癌中可能具有双重角色, 即在早期抑制肿瘤发生, 而在转移的肿瘤中则促进癌细胞的扩散。

前列腺癌患者的尿液沉渣中AGR2 mRNA水平上升, ROC(receiver operator characteristic)曲线分析表明, 尿液中AGR2/PSA转录本比率作为前列腺癌检测的一个指标优于现有的以血液中PSA(前列腺特异抗原)水平作为前列腺癌的诊断标准^[44]; Wayner等^[45]发明了一种尿液中检测AGR2的Elisa方法, 检测到3.6~181 pg/mL浓度的AGR2。在转移性前列腺癌中, AGR2 mRNA在循环肿瘤细胞(circulating tumor cells, CTC)中表达升高, 也可以作为诊断的标志物^[46]。

3.3 AGR2与胰腺癌

在胰腺癌中, 几乎所有原位和扩散的肿瘤细胞AGR2都有非常高的表达, 而且在胰腺上皮早期癌变组织中表达已有增高。因此, 在分析AGR2表达与胰腺癌临床病理发展的关系时, 未能发现明显的相关性^[8]。但AGR2仍趋向表达于转移的肿瘤中, 利用基因芯片或蛋白芯片, 扫描转移的胰腺癌与原位胰腺癌, 都能发现AGR2表达的差别^[9,47-48]。

与在乳腺癌一样, AGR2也被认为是胰腺癌转移的标记蛋白^[48]。Ramachandran等^[8]通过RNA干扰技术发现, 沉默AGR2会降低原位肿瘤的生长, 减弱

癌细胞的浸润性,还增强了对吉西他滨的敏感性;用敲除*AGR2*细胞的条件性培养基培养细胞时,细胞的增殖能力和侵袭能力都降低,对吉西他滨的敏感性也被提高^[8]。Dumartin等^[24]研究发现,*AGR2*在胰腺细胞中,调节多种内质网(ER)伴侣蛋白(PDI、CALU、RCN1)的表达,影响泛素降解途径多个蛋白(HIP2、PSMB2、PSMA3、PSMC3、PSMB4)和溶酶体蛋白酶[组织蛋白酶B(CTSB)和组织蛋白酶D(CTSD)]的功能。*AGR2*和这些蛋白一起,特别是CTSB、CTSD促进胰腺癌细胞的转移^[24]。小鼠*AGR2*的一个等位基因如果缺失,会使胰腺导管癌的发生延迟甚至完全阻碍其形成,表明*AGR2*或许是原癌基因*K-ras*下游的一个重要因子,因为这条信号通路会使肿瘤发生恶性转变^[26]。在胰腺癌中,TGF- β 下调*AGR2*的表达^[49]。Smad4的缺失会使*AGR2*上调,进而,肿瘤黏液蛋白MUC1的表达受*AGR2*的控制,当它们在胰腺上皮内瘤共表达时,一起促使形成上皮内瘤的病变,并进一步发展成胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)。因此,Smad4缺失,可能依赖*AGR2*和MUC1的共同作用导致TGF- β 从肿瘤抑制信号变为肿瘤促进因子^[49]。

尽管*AGR2*表达不能预测胰腺癌恶性病变,但*AGR2*的存在却是胰腺癌发生的明确诊断指标^[8-9]。特别*AGR2*是一个分泌蛋白,可分泌至胰液或血清中^[8,50-51]。利用定量的蛋白组学技术,可明显检测到各级胰腺癌的胰液和血清中的*AGR2*^[50];它的含量无论在良性或恶性的胰腺癌都显著高于正常对照组^[50-51]。共焦显微镜和流式细胞仪分析表明,*AGR2*既可位于胰腺癌细胞的内质网(ER),也可存在于细胞外表面,可能是一个新的细胞表面抗原^[24]。它的细胞表面定位,更易于作为标记蛋白被检测到,也可能为早期检测和治疗提供新的方法。

3.4 *AGR2*与消化道癌

消化道是重要的腺体器官,存在大量的分泌腺细胞,像在其他腺体一样,*AGR2*也在消化道的发育和疾病中具有重要的作用。如前所述,*AGR2*对保持小肠上皮细胞的增殖和终端分化至关重要,它的异常将导致消化道上皮细胞增殖和分化的紊乱,诱导疾病包括肿瘤的产生。

在食道癌中,*AGR2*对肿瘤的转移和生长都具有非常重要的作用。Barrett's食管是能够发展成腺癌的癌前病变,主要表现为鳞状上皮被含杯状细胞

的柱状上皮所取代^[11]。*AGR2*在Barrett's上皮表达升高,可能通过激活Hippo信号通路中的共激活因子YAP1,来诱导双调蛋白的表达;该蛋白是EGFR的配体,从而增强Barrett's上皮的存活和增殖^[52];Wang等^[53]研究发现,在体外用RNA干扰技术使食道癌细胞系SEG-1的*AGR2*表达量减少可以显著降低细胞在软琼脂中的锚定不依赖性菌落生长和密度依赖性生长,而在有*AGR2*表达的NIH3T3细胞中,增强了病灶的形成和细胞锚定不依赖性生长^[53]。同时体内研究表明,表达*AGR2*的NIH3T3细胞可以在裸鼠中形成肿瘤,沉默*AGR2*则会降低移植瘤的大小^[53]。在SEG-1细胞系、NIH3T3细胞系分别敲除和过表达*AGR2*,然后用正常培养基和低血清培养基进行培养,发现细胞增殖率并没有变化,因此推测*AGR2*促进肿瘤生长不是直接作用于细胞的增殖而是通过其他方式^[53]。*AGR2*被发现高表达食管腺癌组织,而只在少量的食管鳞癌组织有微弱的表达,提示它可能是区分食管腺癌和鳞癌的标记蛋白^[12]。*AGR2*与黏蛋白5AC联合作为食道腺癌的诊断标准是高度敏感的,特别是对于P63阴性、细胞角蛋白5/6阴性的腺癌^[10]。

在正常小鼠的小肠中,*AGR2*类似硫氧还中心结构域中的一个半胱氨酸残基与小肠黏液蛋白MUC2形成混合二硫键,参与黏液蛋白MUC2的产生^[54];*AGR2*^{-/-}小鼠和Tamoxifen诱导性*AGR2*^{-/-}小鼠中ER应激相关蛋白表达升高,小肠杯状细胞形态改变,黏蛋白MUC2数量减少,潘氏细胞定位异常;*AGR2*蛋白作为PDI家族成员,在ER应激和小肠自稳态中具有作用,是小肠炎疾病相关因子^[26]。在树突状细胞(dendritic cells, DC)中表达外源*AGR2*时,不影响DC细胞的成熟和分泌细胞因子。但有趣的是,表达*AGR2*的DC细胞,却增加了能够裂解结肠直肠癌细胞的T细胞数量;这些T细胞包括能分泌IFN- γ 的T细胞和产生*AGR2*特异性细胞毒素的T淋巴细胞^[55-56];*AGR2*表达于多种结肠直肠癌细胞系,在血液中*AGR2*和肠道干细胞标志物*LGR5* mRNA水平的升高,也提示血液中可能有脱落肿瘤细胞或者干细胞样肿瘤细胞,标志着差的结肠直肠癌预后^[57-58]。

3.5 *AGR2*与其他癌症

作为腺体分泌的因子,*AGR2*在越来越多的分泌腺癌中被发现。*AGR2*被认为是肺癌的诊断标记,表达于大部分的腺癌病例,它的缺失与病人的差预

后相关^[59-61]。而且在肺癌病人的血清中,检测到显著水平的AGR2,而且AGR2的水平与复发和差预后呈正相关^[62]。而在肺癌细胞系中,导入AGR2载体与导入突变的P53 HIS175(作为proto-oncogene),相比于对照组,都增强了菌落形成;当删除AGR2蛋白C-端10个氨基酸时,其增强菌落形成的效应消失,与导入空载体时无异。令人意外的是,导入AGR2载体后的稳转细胞系与正常情况下相比,G₁/S和G₂/M的分布十分相似,说明过表达AGR2并不干扰细胞周期,而有可能是影响了应急条件下细胞的存活能力^[11]。在肝癌中,AGR2在大部分纤维板层肝细胞癌及转移的肝癌细胞过表达,而典型的原位肝细胞癌(HCC)不表达,提示AGR2可能促进癌细胞的转移^[63-65];利用TAP纯化AGR2结合蛋白,揭示AGR2作用多与MAPK和Caspase信号有关^[64]。但在成人和胎儿肝脏中大型胆管和胆囊上皮细胞AGR2显示强染色,肝门及肝内胆管癌也高表达AGR2,显示AGR2与分泌型的胆管癌有关^[65]。AGR2也被认为是卵巢癌的标志蛋白,它广泛表达于低级别卵巢癌(I型)及正常细胞,只有少量表达于高级别卵巢癌(II型);但II型卵巢癌中,它的表达却与差预后有关,预示较短的生存时间^[66-68]。用Elisa在血清中也发现AGR2与卵巢癌的相关性^[69-70]。过表达AGR2,可促进卵巢癌细胞增殖和迁移^[70]。另外,在头颈鳞状癌^[71]及膀胱癌中都发现了AGR2的作用,可能与这些肿瘤的恶性转移有关。

4 AGR2在癌症防治中的应用前景

随着研究的逐渐深入,AGR2在癌症中的关键调控逐渐明确。它可作为细胞质内蛋白或者通过分泌形式,介导炎症反应、外界刺激等,调控内质网应激、影响P53的活性,从而调节肿瘤细胞的存活、黏附和转移,增强肿瘤的恶性癌变,并且对药物的治疗AGR2也能促进癌细胞的抵抗。因此,AGR2是一个重要的癌症治疗靶点,已有尝试利用AGR2作为表面抗原,发展肿瘤的免疫治疗^[55]。更重要的是,AGR2的重要作用使它成为很有潜力的癌症临床诊断标记。尽管AGR2的表达在不同的癌症中,与癌症发展阶段以及病人的生存有不同的相关性,但总的来说,AGR2是一个癌症的恶性病变标记,已被公认是一个肿瘤转移分泌蛋白。因此,发展以AGR2为靶标的诊断方法,也迅速受到了关注;特别是已在多种癌症的血液、尿液、消化道黏液以及肿瘤组织液中发现分

泌出来的AGR2或者扩散脱落到血液中的癌细胞的AGR2,在癌症的诊断中更具有价值。已有尝试发展灵敏的ELISA方法,检测血液或尿液中的AGR2^[45];也有尝试利用多肽适配体作为探针检测液体中的AGR2^[72];我们也利用核酸适配体(DNA aptamer),寻找了一些AGR2的结合探针^[73]。总之,随着AGR2研究的深入,它对于了解肿瘤的发生机制、个体化诊疗、预后判断的重要意义也将愈加显著。

参考文献 (References)

- 1 Thompson DA, Weigel RJ. hAG-2, the human homologue of the *Xenopus laevis* cement gland gene XAG-2, is coexpressed with estrogen receptor in breast cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 251(1): 111-6.
- 2 Fletcher GC, Patel S, Tyson K, Adam PJ, Schenker M, Loader JA, et al. hAG-2 and hAG-3, human homologues of genes involved in differentiation, are associated with oestrogen receptor-positive breast tumours and interact with metastasis gene C4.4a and dystroglycan. *Br J Cancer* 2003; 88(4): 579-85.
- 3 Zhang Y, Forootan SS, Liu D, Barraclough R, Foster CS, Rudland PS, et al. Increased expression of anterior gradient-2 is significantly associated with poor survival of prostate cancer patients. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2007; 10(3): 293-300.
- 4 Zhang JS, Gong A, Chevillat JC, Smith DL, Young CY. AGR2, an androgen-inducible secretory protein overexpressed in prostate cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 43(3): 249-59.
- 5 Innes HE, Liu D, Barraclough R, Davies MP, O'Neill PA, Platt-Higgins A, et al. Significance of the metastasis-inducing protein AGR2 for outcome in hormonally treated breast cancer patients. *Br J Cancer* 2006; 94(7): 1057-65.
- 6 Fritzsche FR, Dahl E, Pahl S, Burkhardt M, Luo J, Mayordomo E, et al. Prognostic relevance of AGR2 expression in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2006; 12(6): 1728-34.
- 7 Barraclough DL, Platt-Higgins A, de Silva Rudland S, Barraclough R, Winstanley J, West CR, et al. The metastasis-associated anterior gradient 2 protein is correlated with poor survival of breast cancer patients. *Am J Pathol* 2009; 175(5): 1848-57.
- 8 Ramachandran V, Arumugam T, Wang H, Logsdon CD. Anterior gradient 2 is expressed and secreted during the development of pancreatic cancer and promotes cancer cell survival. *Cancer Res* 2008; 68(19): 7811-8.
- 9 Riener MO, Pilarsky C, Gerhardt J, Grutzmann R, Fritzsche FR, Bahra M, et al. Prognostic significance of AGR2 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Histol Histopathol* 2009; 24(9): 1121-8.
- 10 DiMaio MA, Kwok S, Montgomery KD, Lowe AW, Pai RK. Immunohistochemical panel for distinguishing esophageal adenocarcinoma from squamous cell carcinoma: A combination of p63, cytokeratin 5/6, MUC5AC, and anterior gradient homolog 2 allows optimal subtyping. *Hum Pathol* 2012; 43(11): 1799-807.
- 11 Pohler E, Craig AL, Cotton J, Lawrie L, Dillon JF, Ross P, et al. The Barrett's antigen anterior gradient-2 silences the p53 transcriptional response to DNA damage. *Mol Cell Proteomics* 2004; 3(6): 534-47.
- 12 Pizzi M, Fassan M, Realdon S, Balistreri M, Battaglia G, Gia-

- cometti C, *et al.* Anterior gradient 2 profiling in Barrett columnar epithelia and adenocarcinoma. *Hum Pathol* 2012; 43(11): 1839-44.
- 13 Brychtova V, Vojtesek B, and Hrstka R. Anterior gradient 2: A novel player in tumor cell biology. *Cancer Lett* 2011; 304(1): 1-7.
- 14 Salmans ML, Zhao F, Andersen B. The estrogen-regulated anterior gradient 2 (AGR2) protein in breast cancer: A potential drug target and biomarker. *Breast Cancer Res* 2013; 15(2): 204.
- 15 Gupta A, Dong A, Lowe AW. AGR2 gene function requires a unique endoplasmic reticulum localization motif. *J Biol Chem* 2012; 287(7): 4773-82.
- 16 Patel P, Clarke C, Barraclough DL, Jowitt TA, Rudland PS, Barraclough R, *et al.* Metastasis-promoting anterior gradient 2 protein has a dimeric thioredoxin fold structure and a role in cell adhesion. *J Mol Biol* 2013; 425(5): 929-43.
- 17 Liu D, Rudland PS, Sibson DR, Platt-Higgins A, Barraclough R. Human homologue of cement gland protein, a novel metastasis inducer associated with breast carcinomas. *Cancer Res* 2005; 65(9): 3796-805.
- 18 Vanderlaag KE, Hudak S, Bald L, Fayadat-Dilman L, Sathe M, Grein J, *et al.* Anterior gradient-2 plays a critical role in breast cancer cell growth and survival by modulating cyclin D1, estrogen receptor-alpha and survivin. *Breast Cancer Res* 2010; 12(3): R32.
- 19 Zweitzig DR, Smirnov DA, Connelly MC, Terstappen LW, O'Hara SM, Moran E. Physiological stress induces the metastasis marker AGR2 in breast cancer cells. *Mol Cell Biochem* 2007; 306(1/2): 255-60.
- 20 Ambolet-Camoit A, Bui LC, Pierre S, Chevallier A, Marchand A, Coumoul X, *et al.* 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin counteracts the p53 response to a genotoxicant by upregulating expression of the metastasis marker agr2 in the hepatocarcinoma cell line HepG2. *Toxicol Sci* 2010; 115(2): 501-12.
- 21 Persson S, Rosenquist M, Knoblach B, Khosravi-Far R, Sommarin M, Michalak M. Diversity of the protein disulfide isomerase family: Identification of breast tumor induced Hag2 and Hag3 as novel members of the protein family. *Mol Phylogenet Evol* 2005; 36(3): 734-40.
- 22 Wilkinson B, Gilbert HF. Protein disulfide isomerase. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1699(1/2): 35-44.
- 23 Maresh EL, Mah V, Alavi M, Horvath S, Bagryanova L, Liebeskind ES, *et al.* Differential expression of anterior gradient gene AGR2 in prostate cancer. *BMC Cancer* 2010; 10: 680.
- 24 Dumartin L, Whiteman HJ, Weeks ME, Hariharan D, Dmitrovic B, Iacobuzio-Donahue CA, *et al.* AGR2 is a novel surface antigen that promotes the dissemination of pancreatic cancer cells through regulation of cathepsins B and D. *Cancer Res* 2011; 71(22): 7091-102.
- 25 Niederreiter L, Kaser A. Endoplasmic reticulum stress and inflammatory bowel disease. *Acta Gastroenterol Belg* 2011; 74(2): 330-3.
- 26 Zhao F, Edwards R, Dizon D, Afrasiabi K, Mastroianni JR, Geyfman M, *et al.* Disruption of Paneth and goblet cell homeostasis and increased endoplasmic reticulum stress in *Agr2⁺* mice. *Dev Biol* 2009; 338(2): 270-9.
- 27 Higa A, Mulot A, Delom F, Bouchecareilh M, Nguyen DT, Boismenu D, *et al.* Role of pro-oncogenic protein disulfide isomerase (PDI) family member anterior gradient 2 (AGR2) in the control of endoplasmic reticulum homeostasis. *J Biol Chem* 2011; 286(52): 44855-68.
- 28 Zheng W, Rosenstiel P, Huse K, Sina C, Valentonyte R, Mah N, *et al.* Evaluation of AGR2 and AGR3 as candidate genes for inflammatory bowel disease. *Genes Immun* 2006; 7(1): 11-8.
- 29 Aberger F, Weidinger G, Grunz H, Richter K. Anterior specification of embryonic ectoderm: the role of the *Xenopus* cement gland-specific gene XAG-2. *Mech Dev* 1998; 72(1/2): 115-30.
- 30 Kumar A, Nevill G, Brockes JP, Forge A. A comparative study of gland cells implicated in the nerve dependence of salamander limb regeneration. *J Anat* 2010; 217(1): 16-25.
- 31 Chen, YC, Lu YF, Li IC, Hwang SP. Zebrafish *Agr2* is required for terminal differentiation of intestinal goblet cells. *PLoS One* 2012; 7(4): e34408.
- 32 Gupta A, Wodziak D, Tun M, Bouley DM, Lowe AW. Loss of anterior gradient 2 (*Agr2*) expression results in hyperplasia and defective lineage maturation in the murine stomach. *J Biol Chem* 2013; 288(6): 4321-33.
- 33 Verma S, Salmans ML, Geyfman M, Wang H, Yu Z, Lu Z, *et al.* The estrogen-responsive *Agr2* gene regulates mammary epithelial proliferation and facilitates lobuloalveolar development. *Dev Biol* 2012; 369(2): 249-60.
- 34 Hrstka R, Murray E, Brychtova V, Fabian P, Hupp TR, Vojtesek B. Identification of an AKT-dependent signalling pathway that mediates tamoxifen-dependent induction of the pro-metastatic protein anterior gradient-2. *Cancer Lett* 2013; 333(2): 187-93.
- 35 Hrstka R, Nenutil R, Fourtouna A, Maslon MM, Naughton C, Langdon S, *et al.* The pro-metastatic protein anterior gradient-2 predicts poor prognosis in tamoxifen-treated breast cancers. *Oncogene* 2010; 29(34): 4838-47.
- 36 Mackay A, Urruticoechea A, Dixon JM, Dexter T, Fenwick K, Ashworth A, *et al.* Molecular response to aromatase inhibitor treatment in primary breast cancer. *Breast Cancer Res* 2007; 9(3): R37.
- 37 Maslon MM, Hrstka R, Vojtesek B, Hupp TR. A divergent substrate-binding loop within the pro-oncogenic protein anterior gradient-2 forms a docking site for Reptin. *J Mol Biol* 2010, 404(3): 418-38.
- 38 Shishkin SS, Kovalyov LI, Kovalyova MA, Lisitskaya KV, Ermina LS, Ivanov AV, *et al.* "Prostate cancer proteomics" database. *Acta Naturae* 2010; 2(4): 95-104.
- 39 Bu H, Schweiger MR, Manke T, Wunderlich A, Timmermann B, Kerick M, *et al.* Anterior gradient 2 and 3 two prototype androgen-responsive genes transcriptionally upregulated by androgens and by oestrogens in prostate cancer cells. *Febs J* 2013; 280(5): 1249-66.
- 40 Hu Z, Gu Y, Han B, Zhang J, Li Z, Tian K, *et al.* Knockdown of AGR2 induces cellular senescence in prostate cancer cells. *Carcinogenesis* 2012; 33(6): 1178-86.
- 41 Zhao L, Lee BY, Brown DA, Molloy MP, Marx GM, Pavlakis N, *et al.* Identification of candidate biomarkers of therapeutic response to docetaxel by proteomic profiling. *Cancer Res* 2009; 69(19): 7696-703.
- 42 Zhang Y, Ali TZ, Zhou H, D'Souza DR, Lu Y, Jaffe J, *et al.* ErbB3 binding protein 1 represses metastasis-promoting gene anterior gradient protein 2 in prostate cancer. *Cancer Res* 2010; 70(1): 240-8.
- 43 Ho ME, Quek SI, True LD, Morrissey C, Corey E, Vessella RL, *et al.* Prostate cancer cell phenotypes based on AGR2 and CD10 expression. *Mod Pathol* 2013; 26(6): 849-59.

- 44 Bu H, Bormann S, Schafer G, Horninger W, Massoner P, Neeb A, *et al.* The anterior gradient 2 (AGR2) gene is overexpressed in prostate cancer and may be useful as a urine sediment marker for prostate cancer detection. *Prostate* 2010; 71(6): 575-87.
- 45 Wayner EA, Quek SI, Ahmad R, Ho ME, Loprieno MA, Zhou Y, *et al.* Development of an ELISA to detect the secreted prostate cancer biomarker AGR2 in voided urine. *Prostate* 2012; 72(9): 1023-34.
- 46 Kani K, Malihi PD, Jiang Y, Wang H, Wang Y, Ruderman DL, *et al.* Anterior gradient 2 (AGR2): Blood-based biomarker elevated in metastatic prostate cancer associated with the neuroendocrine phenotype. *Prostate* 2013; 73(3): 306-15.
- 47 McKinney KQ, Lee JG, Sindram D, Russo MW, Han DK, Bonkovsky HL, *et al.* Identification of differentially expressed proteins from primary versus metastatic pancreatic cancer cells using subcellular proteomics. *Cancer Genomics Proteomics* 2012; 9(5): 257-63.
- 48 Barry S, Chelala C, Lines K, Sunamura M, Wang A, Marelli-Berg FM, *et al.* S100P is a metastasis-associated gene that facilitates transendothelial migration of pancreatic cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 2013; 30(3): 251-64.
- 49 Norris AM, Gore A, Balboni A, Young A, Longnecker DS, Korc M. AGR2 is a SMAD4-suppressible gene that modulates MUC1 levels and promotes the initiation and progression of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Oncogene* 2012; 32(33): 3867-76.
- 50 Makawita S, Smith C, Batruch I, Zheng Y, Ruckert F, Grutzmann R, *et al.* Integrated proteomic profiling of cell line conditioned media and pancreatic juice for the identification of pancreatic cancer biomarkers. *Mol Cell Proteomics* 2011; 10(10): M111.008599.
- 51 Chen R, Pan S, Duan X, Nelson BH, Sahota RA, de Rham S, *et al.* Elevated level of anterior gradient-2 in pancreatic juice from patients with pre-malignant pancreatic neoplasia. *Mol Cancer* 2010; 9: 149.
- 52 Dong A, Gupta A, Pai RK, Tun M, Lowe AW. The human adenocarcinoma-associated gene, AGR2, induces expression of amphiregulin through Hippo pathway co-activator YAP1 activation. *J Biol Chem* 2011; 286(20): 18301-10.
- 53 Wang Z, Hao Y, Lowe AW. The adenocarcinoma-associated antigen, AGR2, promotes tumor growth, cell migration, and cellular transformation. *Cancer Res* 2008; 68(2): 492-7.
- 54 Park SW, Zhen G, Verhaeghe C, Nakagami Y, Nguyenvu LT, Barczak AJ, *et al.* The protein disulfide isomerase AGR2 is essential for production of intestinal mucus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(17): 6950-5.
- 55 Lee HJ, Hong CY, Kim MH, Lee YK, Nguyen-Pham TN, Park BC, *et al.* *In vitro* induction of anterior gradient-2-specific cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells transduced with recombinant adenoviruses as a potential therapy for colorectal cancer. *Exp Mol Med* 2012; 44(1): 60-7.
- 56 Lee HJ, Hong CY, Jin CJ, Kim MH, Lee YK, Nguyen-Pham TN, *et al.* Identification of novel HLA-A*0201-restricted epitopes from anterior gradient-2 as a tumor-associated antigen against colorectal cancer. *Cell Mol Immunol* 2012; 9(2): 175-83.
- 57 Valladares-Ayerbes M, Blanco-Calvo M, Reboredo M, Lorenzo-Patino MJ, Iglesias-Diaz P, Haz M, *et al.* Evaluation of the adenocarcinoma-associated gene AGR2 and the intestinal stem cell marker LGR5 as biomarkers in colorectal cancer. *Int J Mol Sci* 2012; 13(4): 4367-87.
- 58 Valladares-Ayerbes M, Diaz-Prado S, Reboredo M, Medina V, Iglesias-Diaz P, Lorenzo-Patino MJ, *et al.* Bioinformatics approach to mRNA markers discovery for detection of circulating tumor cells in patients with gastrointestinal cancer. *Cancer Detect Prev* 2008; 32(3): 236-50.
- 59 Chung K, Nishiyama N, Wanibuchi H, Yamano S, Hanada S, Wei M, *et al.* AGR2 as a potential biomarker of human lung adenocarcinoma. *Osaka City Med J* 2012; 58(1): 13-24.
- 60 Pizzi M, Fassan M, Balistreri M, Galligioni A, Rea F, Rugge M. Anterior gradient 2 overexpression in lung adenocarcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2012; 20(1): 31-6.
- 61 Fritzsche FR, Dahl E, Dankof A, Burkhardt M, Pahl S, Petersen I, *et al.* Expression of AGR2 in non small cell lung cancer. *Histol Histopathol* 2007; 22(7): 703-8.
- 62 Chung K, Nishiyama N, Yamano S, Komatsu H, Hanada S, Wei M, *et al.* Serum AGR2 as an early diagnostic and postoperative prognostic biomarker of human lung adenocarcinoma. *Cancer Biomark* 2012; 10(2): 101-7.
- 63 Vivekanandan P, Micchelli ST, Torbenson M. Anterior gradient-2 is overexpressed by fibrolamellar carcinomas. *Hum Pathol* 2009; 40(3): 293-9.
- 64 Yu H, Zhao J, Lin L, Zhang Y, Zhong F, Liu Y, *et al.* Proteomic study explores AGR2 as pro-metastatic protein in HCC. *Mol Biosyst* 2012; 8(10): 2710-8.
- 65 Lepreux S, Bioulac-Sage P, Chevet E. Differential expression of the anterior gradient protein-2 is a conserved feature during morphogenesis and carcinogenesis of the biliary tree. *Liver Int* 2011; 31(3): 322-8.
- 66 Darb-Esfahani S, Fritzsche F, Kristiansen G, Weichert W, Sehouli J, Braicu I, *et al.* Anterior gradient protein 2 (AGR2) is an independent prognostic factor in ovarian high-grade serous carcinoma. *Virchows Arch* 2012; 461(2): 109-16.
- 67 Armes JE, Davies CM, Wallace S, Taheri T, Perrin LC, Autelitano DJ. AGR2 expression in ovarian tumours: A potential biomarker for endometrioid and mucinous differentiation. *Pathology* 2013; 45(1): 49-54.
- 68 Rice GE, Edgell TA, Autelitano DJ. Evaluation of midkine and anterior gradient 2 in a multimarker panel for the detection of ovarian cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2010; 29: 62.
- 69 Edgell TA, Barraclough DL, Rajic A, Dhulia J, Lewis KJ, Armes JE, *et al.* Increased plasma concentrations of anterior gradient 2 protein are positively associated with ovarian cancer. *Clin Sci (Lond)* 2010; 118(12): 717-25.
- 70 Park K, Chung YJ, So H, Kim K, Park J, Oh M, *et al.* AGR2, a mucinous ovarian cancer marker, promotes cell proliferation and migration. *Exp Mol Med* 2011; 43(2): 91-100.
- 71 Sweeny L, Liu Z, Bush BD, Hartman Y, Zhou T, Rosenthal EL. CD147 and AGR2 expression promote cellular proliferation and metastasis of head and neck squamous cell carcinoma. *Exp Cell Res* 2012; 318(14): 1788-98.
- 72 Murray E, McKenna EO, Burch LR, Dillon J, Langridge-Smith P, Kolch W, *et al.* Microarray-formatted clinical biomarker assay development using peptide aptamers to anterior gradient-2. *Biochemistry* 2007; 46(48): 13742-51.
- 73 Wu J, Wang C, Li X, Song Y, Wang W, Li C, *et al.* Identification, characterization and application of a G-quadruplex structured DNA aptamer against cancer biomarker protein anterior gradient homolog 2. *PLoS One* 2012; 7(9): e46393.