

· 基础研究 ·

紫杉醇耐药细胞与敏感细胞分泌蛋白 差异凝胶电泳分析

孙强玲 杨晓华 鲁静 谢银银 储天晴 沙慧芳

【摘要】背景与目的 紫杉醇是用于肺癌临床一线治疗的作用于微管蛋白的化疗药物，而耐药是影响其疗效的关键因素。本研究应用蛋白组学技术整体比较紫杉醇耐药细胞与敏感细胞分泌蛋白表达谱，以期发现肺癌紫杉醇耐药相关分泌蛋白标志物，为临床选择有针对性的化疗药物提供依据。方法 收集A549亲代及耐药细胞培养液中的蛋白，应用差异凝胶电泳（DIGE）进行分离，Decyder 6.5软件分析后获得的差异蛋白点通过基质辅助激光解析电离飞行时间质谱（MALDI-TOF-MS）进行鉴定。结果 应用DIGE进行分离后，成功获得了蛋白质组分辨率高、重复性好的双向凝胶电泳图谱，Decyder 6.5软件分析获得差异>2倍以上的蛋白质点共有76个，经质谱鉴定了19种蛋白，鉴定的蛋白涉及代谢酶类、细胞外基质降解酶类、粘附分子、细胞因子和信号转导相关蛋白质。结论 本研究首次应用双向电泳技术整体展示了紫杉醇耐药细胞株及敏感细胞株的分泌蛋白表达谱，并分析、鉴定、筛选出与紫杉醇耐药相关的差异分泌蛋白。该研究为非小细胞肺癌血清耐药标志物的筛选提供了新的方法和候选分子。

【关键词】 差异凝胶电泳；蛋白组学；分泌蛋白；紫杉醇；肺肿瘤

【中图分类号】 R734.2 DOI:10.3779/j.issn.1009-3419.2009.07.001

Analysis of Differential Gel Electrophoresis of Paclitaxol Resistant and Sensitive Lung Adenocarcinoma Cells' Secretome

Qiangling SUN, Xiaohua YANG, Jing LU, Yinyin XIE, Tianqing CHU, Huifang SHA

Basic Research Laboratory, Chest Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China

Corresponding author: Huifang SHA, E-mail: shahuifang5316@126.com

【Abstract】 Background and objective Paclitaxol (PTX) resistance is one of main factors which affect the outcome of chemotherapy of lung adenocarcinoma. The aim of this study is to compare the secreted protein expression profiles between Paclitaxol (PTX) resistant and sensitive lung adenocarcinoma cells by proteomic research method, so as to provide evidence of choosing individual chemotherapy drugs in clinical treatment. **Methods** Total secreted proteins extracted from a PTX sensitive cell line A549 and a PTX resistant cell line A549-Taxol were separated by fluorescent differential gel electrophoresis (DIGE). High quality 2-DE profiles were obtained and analyzed by Decyder 6.5 analysis software to screen differentially expressed protein spots. Those spots were identified by mass spectrometry. **Results** 2-DE patterns of lung adenocarcinoma cells with high-resolution and reproducibility were obtained. 76 significantly differentially expressed protein spots were screened, 19 proteins were identified by mass spectrometry. The identified proteins could be classified into different categories: metabolic enzyme, extracellular matrix (ECM) degradation enzyme, cytokine, signal transducer, cell adhesion, and so on. **Conclusion** Multiple secreted proteins related to chemoresistance of A549-Taxol cells were identified in this study for the first time. The results presented here would provide clues to identify new serologic chemoresistant biomarkers of NSCLC.

【Key words】 Differential gel electrophoresis; Proteomics; Secreted protein; Paclitaxol; Lung neoplasms

This study was supported by a grant from the Shanghai United Munciple Hospital Project (to Huifang SHA)(No. SHDC12007103) and a grant for cancer research from Shanghai charity foundation (to Qiangling SUN).

本研究受上海市市级医院新兴前沿技术联合攻关项目（沙慧芳）（No. SHDC12007103）和上海市癌症研究慈善基金（孙强玲）资助

作者单位：200030 上海，上海交通大学附属胸科医院基础研究室（孙强玲，杨晓华，沙慧芳），肺内科（储天晴）；200025 上海，上海交通大学附属瑞金医院血液研究所（鲁静，谢银银）（通讯作者：沙慧芳，E-mail: shahuifang5316@126.com）

肺癌是我国乃至世界的高发恶性肿瘤之一，目前肺癌的发病率仍呈逐年上升趋势，已成为恶性肿瘤中威胁人类健康的第一杀手^[1]。紫杉醇是近年来应用于临床的一种有效的化疗药物，是治疗肺癌的一线用药，其独特的作用机制使其具有良好的应用前景^[2]，然而耐药性尤其是快速而又几乎普遍发生的获得性耐药在很大程度上限制了紫杉醇抗癌治疗的长期疗效^[3]，影响了其临床应

用。

考虑肺癌细胞中与耐药相关的分泌蛋白可能会随着癌细胞的异常增生而在血清中集聚,使之成为一种可以检测的肺癌标志物,鉴定这些分泌蛋白将具有极其重要的意义^[4]。为此我们拟通过培养人肺腺癌细胞系A549及对紫杉醇耐药株收集分泌蛋白,应用DIGE技术进行分离、质谱及生物信息学分析鉴定,旨在寻找耐药相关的分泌蛋白,为临床化疗药的应用提供切实的依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 人源性A549肺腺癌细胞系为上海胸科医院基础研究室常规传代培养,肺腺癌对紫杉醇耐药细胞系A549/Taxol为本实验室通过体外浓度递增和短时作用法,从亲代A549细胞株中诱导分离出。A549/Taxol细胞的紫杉醇半数抑制浓度(IC₅₀)是亲代A549细胞的512倍。尿素、IPG缓冲液、IPG胶条(13 cm, 3-10NL)、2D-Clean up纯化试剂盒及CyDye最小标记法试剂盒、IPGphor等电聚焦仪、Hoefer SE600垂直电泳仪、Typhoon9400荧光扫描仪均购自GE公司;二硫苏糖醇(DTT)、硫脲购自Sigma公司;CHAPS、碘乙酰胺购自Fluka公司;乙腈购自Merck公司;其他常用试剂为国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 采用本实验室保存的人肺腺癌细胞系A549细胞和本室诱导建立的耐紫杉醇的人肺腺癌细胞株模型A549/Taxol,用含15%胎牛血清的1640培养基培养,A549/Taxol细胞培养基中另需加泰素帝(多西紫杉醇)维持浓度在1 mg/L,并严格控制每一批耐药细胞的耐药指数为512。细胞融合达70%时,弃去培养液,用Hank液洗涤3次,换无血清培养基继续培养48 h,收集细胞达90%融合的培养液上清。

1.2.2 分泌蛋白样品的制备 收集无血清培养基,3 000 rpm,离心20 min,去除细胞碎片及不溶物,离心后样品用0.22 μm滤器过滤后加入Amicon-3KD超滤离心管,4 ℃,5 000 rpm,45 min后收集浓缩样品用1:5的比例加入预冷(-20 ℃)的丙酮溶液,放入-20 ℃冰箱过夜后离心(4 ℃,15 000 rpm,15 min)。弃上清,一部分样品加入2D裂解液复溶,定量后分装于-70 ℃。另外一部分样品加入DIGE裂解液,复溶后用2D-Clean up试剂盒再次纯化后,Bradford法进行蛋白定量后分装于-70 ℃。

1.2.3 SDS-PAGE电泳 10 μg分泌蛋白样品加上样缓冲液100 ℃煮沸5 min,以两种细胞总蛋白作对照,12.5%聚丙烯酰

胺凝胶上进行电泳,银染后扫描成像。

1.2.4 差异凝胶电泳 亲代及耐药细胞系分泌蛋白分别用Cy3或Cy5进行标记,以Cy2为内标,按50 μg蛋白/400 pmol DIGE工作液的比例将待标记蛋白与相应的DIGE工作液暗处混匀标记,并进行样品标记效率检测。将分别由Cy2、Cy3或Cy5标记的样品各50 μg混合,加入等体积的2×上样缓冲液,用泡涨液定容至250 μL,制成一向等电聚焦体系,采用胶内泡涨的方法上样。平行跑3根13 cm干胶条(PH3-10 NL),一向IEF电泳总聚焦为45 KVh。

1.2.5 图像的采集与分析 荧光标记的胶用Typhoon 9400激光扫描仪成像,分别用488 nm、532 nm、635 nm的激发波长扫描Cy2、Cy3和Cy5荧光标记图谱,每个扫描通道均选择100 μm的分辨率。所得的蛋白质组图谱用DeCyder 6.5凝胶图像分析软件分析。每一张胶扫描后得到3张扫描胶图(共9张胶图),对每一张胶图上的所有蛋白点扫描并进行胶内分析(DIA)分析,然后对不同胶上的同一个蛋白点与内标匹配,进行胶间分析(BVA),亲代与耐药组间差异分泌蛋白采用t检验进行定量比较(P<0.05)。选取Average Ratio绝对值>2的点为差异蛋白点。

1.2.6 后续制备胶双向电泳蛋白染色挖点鉴定 取A549亲代及耐药细胞分泌蛋白各500 μg,双向电泳完毕后考染扫描成像后,在考染后的胶上切取差异蛋白点进行鉴定。

1.2.7 MALDI-TOF-MS/MS质谱鉴定 从胶上将蛋白质点切下,用50%的乙腈/50 mM的重碳酸铵脱色,100%的乙腈脱水干燥后,加入10 μg/mL的胰蛋白酶37 ℃孵育过夜。50%乙腈/0.1%三氟乙酸抽提肽段置于96孔板中,氮气吹干。0.8 μL基质反复吹打干燥的肽段,点样于MALDI-TOF质谱靶板上,肌球蛋白作外标校正,用1个20 KV的加速电压进行质谱,每个蛋白点自动选取4个最强肽段峰作串联质谱分析,开始获取数据。得到的肽质量指纹图(PMF)及肽序列采用Mascot搜索引擎搜索IPI数据库,确定蛋白质。

2 结 果

2.1 人肺腺癌亲代及耐紫杉醇细胞分泌蛋白SDS-PAGE电泳图谱的构建 由电泳图(图1)结果发现,A549亲代及耐药细胞分泌蛋白条带有明显的差异,特别是在90 KD以下,耐药系中有一明显浓集条带为亲代细胞系中所没有(箭头所指)。在19 KD以下小分子区,也有多个蛋白条

带为亲代所无。但总体来看，亲代细胞中分泌蛋白条带数要较耐药系中较多。推测紫杉醇可能抑制了某些蛋白的表达。

2.2 A549耐药及亲代细胞株分泌蛋白表达总谱的构建 经过双向差异凝胶电泳，在所有胶上均得到了清晰的蛋白质表达谱。利用Typhoon 9400扫描仪经过488 nm、532 nm和635 nm三个通道的扫描分别获得了由Cy2、Cy3和Cy5标记的内标图谱、人肺腺癌细胞系A549亲代及耐药分泌蛋白图谱（图2）。分析图谱发现亲代细胞系在酸端有多个高峰蛋白，集中于高分子区域，PI 3-5，MW（40-97）KD区域，有部分蛋白呈现明显的拖尾现象，考虑可能存在多种翻译后修饰形式，而耐药细胞系分泌蛋白在碱性端有多个高峰蛋白，集中于高分子区域，PI 5-9，MW（50-97）KD区域。与SDS-PAGE电泳结果较相一致，两图谱之间存在明显的差异，特别是耐药细胞株在PI 7，MW（80-90）KD左右有一串珠状浓集条带为亲代所没有的。这说明紫杉醇作用于肺癌细胞引起肺癌细胞的蛋白表达谱发生了明显的改变。

2.3 Decyder软件进行差异蛋白的分析 所得的蛋白质组图谱用Decyder 6.5凝胶图像分析软件进行点识别、背景

消除、点匹配及差异蛋白质分析。3块胶上平均检测到的蛋白质点为1 681±15个，其中可匹配上的蛋白质点为1 418±20个。选取P<0.05，Av.Ratio<2或Av.Ratio<-2以上的点为差异蛋白点。共有76个差异点符合以上标准，其中在耐药总蛋白中上调的差异点有35个。下调的蛋白质点为41个。其中第1号点在耐药细胞中要较亲代细胞中高出24.99倍，其三维视图和曲线图视图可以清楚的看出该点在两细胞之间的差异（图3）。

2.4 差异蛋白的鉴定结果 后续制备考染蛋白胶挖取40个差异蛋白质点，经脱色、胶内酶解及肽段抽提，进行MALDI-TOF-MS质谱分析，其中26个蛋白质点被成功鉴定出。扣除冗余，实际鉴定出19种蛋白质（表1）。其中在紫杉醇耐药细胞系中明显增高有16种，主要分为以下几类：①代谢酶类：谷胱甘肽转硫酶P1（glutathione-S-transferase P1, GSTP1）、视黄醛脱氢酶1（Retinaldehyde dehydrogenases, RALDH1）、鞘脂激活蛋白原（prosaposin, PSAP）、乳酸脱氢酶B（LDH-B）；②细胞外基质（ECM）降解酶类：组织蛋白酶D（Cathepsin D）、基质金属蛋白酶7（matrilysin 7, MMP7）、三肽基肽酶I（tripeptidyl peptidase I, TPP1）；③细胞粘附相关：巢蛋

表1 质谱鉴定的差异蛋白

Tab 1 Identified differential proteins by MALDI-TOF-MS/MS

No.	Accession No.	Protein name	Protein score	pH	MW (Da)	Coverage
Up-regulated in A549/Taxol secretome						
1	gi 8928569	Nidogen-2 (NID-2)	224	5.08	151 299	23%
274	gi 148876773	Desomoglein-2 (HDGC)	71	5.13	122 218	9%
514	gi 90110780	Nuclebindin-1 (CALNUC)	79	5.15	53 846	19%
545	gi 90110027	KRT8	90	5.52	53 671	11%
1230	gi 124055	IGFBP-1 (IBP-1)	66	5.11	27 885	14%
1528	gi 121746	GST Class-pi (GSTP1-1)	205	5.43	23 341	22%
1409	gi 11861	Matrix metalloproteinase-7 (MMP7)	128	7.74	29 658	9%
171	gi 23396490	Calsyntenin-1	162	4.81	109 724	15%
415	gi 134218	Proactivator polypeptide (PSAP)	60	5.06	58 074	5%
583	gi 108936017	Tripeptidyl peptidase (TPP-1)	132	6.01	61 210	10%
1087	gi 126041	L-lactate dehydrogenase B (LDH-B)	143	5.71	36 615	19%
1211	gi 48428791	β2-microglobulin	72	6.06	13 706	8%
769	gi 115717	Cathepsin D	142	6.10	44 524	22%
633	gi 118495	RALDH1	185	6.30	54 827	17%
387	gi 125987826	Ezrin (p81) (cytovillin)	180	5.94	69 370	15%
411	gi 85700158	Lactotransferrin	68	8.50	78 132	4%
Down-regulated in A549/Taxol secretome						
869	gi 52788229	Phosphoglycerate kinase 1 (PGK1)	165	8.30	44 586	13%
962	gi 113606	Fructose bisphosphate aldolase A	149	8.30	39 395	23%
419	gi 14916999	GRP78	197	5.07	72 288	24%

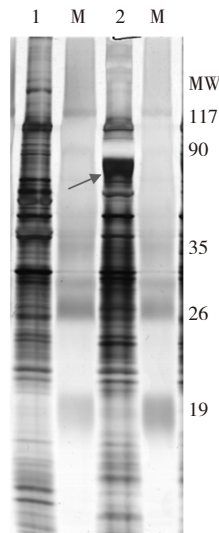


图1 人肺腺癌亲代及耐药细胞系总蛋白和分泌蛋白SDS-PAGE电泳图谱
1: A549分泌蛋白 (10 μg); 2: A549/Taxo1分泌蛋白 (10 μg); M: 蛋白分子量标准 (Fermentas)。

Fig 1 SDS-PAGE of paclitaxol resistant and sensitive lung adenocarcinoma cells' total and secret protein
1: A549 secret protein (10 μg); 2: A549/Taxo1 secret protein (10 μg); M: Molecular Weight Marker (Fermentas).

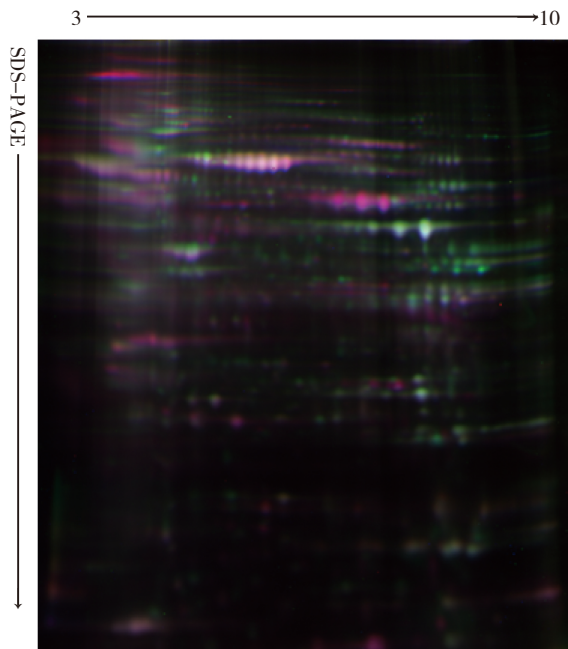


图2 人肺腺癌细胞系A549及其耐紫杉醇细胞系分泌蛋白DIGE叠加图谱
红色图谱-Cy5标记A549/Taxol细胞系分泌蛋白图谱; 绿色图谱-Cy3标记A549细胞系分泌蛋白图谱; 蓝色图谱-Cy2标记内标图谱。

Fig 2 Overlapped DIGE images of A549 and A549/Taxol secretome
Red image-A549/Taxol secretome map, Cy5 label; Green image- A549 secretome map, Cy5 label; Blue image-Internal map, Cy2 label.

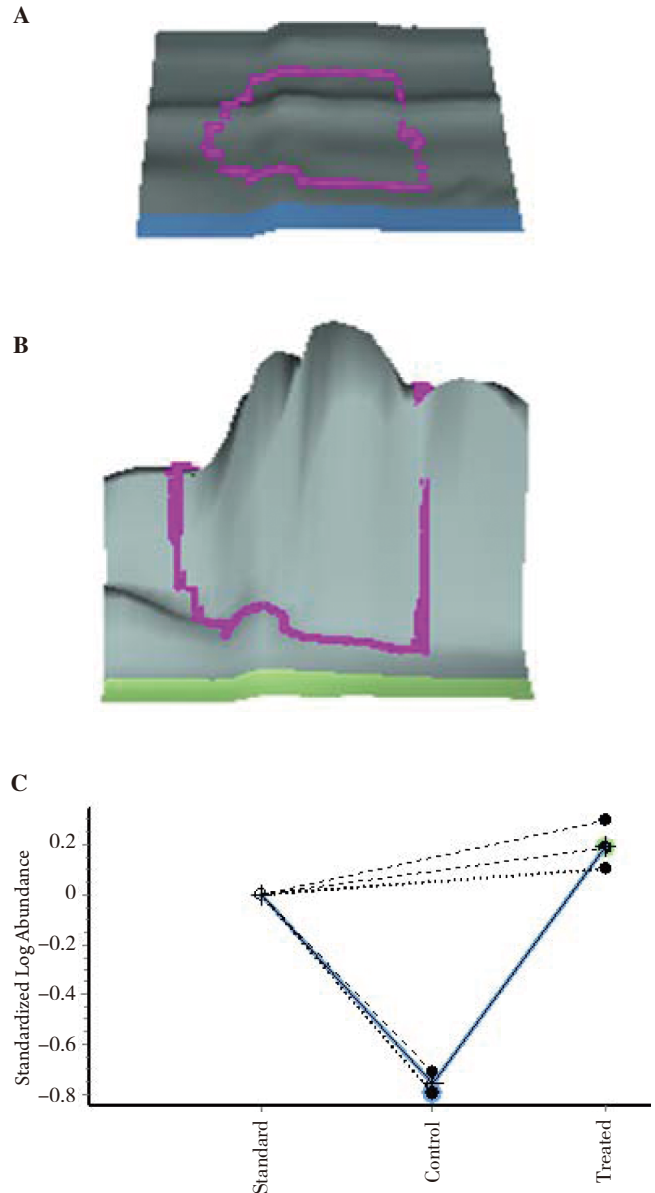


图3 1号蛋白质点的差异表达三维图及曲线图视图

A: 蛋白质点在A549分泌蛋白图谱中的三维图; B: 蛋白质点在A549/Taxo1分泌蛋白图谱中的三维图; C: 1号蛋白质点的曲线图视图 (Control: A549分泌蛋白图谱; Treated: A549/Taxol分泌蛋白)。

Fig 3 Differential 3D Map and Graph view of No.1 spot

A: 3D map of A549 secret protein; B: 3D map of A549-Taxol secret protein; C: The graph view (Control: A549 secret protein; Treated: A549/Taxol secret protein).

白2 (Nidogen-2, NID-2) ; ④细胞因子类: 胰岛素样生长因子结合蛋白-1 (Insulin-like growth factor binding protein 1, IGFBP1) ; ⑤信号转导相关: 埃兹蛋白 (Ezrin) 、钙同线蛋白 (Calsyntenin, CLSTN1) ; ⑥其他: 乳运铁蛋白 (Lactotransferrin) 、 β 2-微球蛋白 (β 2-microglobulin, BMG) 、Nuc核结合素 (Nucleobindin, CALNUC) 、桥粒芯糖蛋白2 (Desmoglein-2, DSG2) 、角蛋白8 (Keratin 8, KRT8) 。

表达下调的蛋白有3种, 它们是: 磷酸甘油酸激酶1 (phosphoglycerate kinase 1, PGK1) 、果糖二磷酸醛缩酶A (Fructose biphosphate aldolase A, ALDOA) 、糖调节蛋白78 (glucose regulated protein 78, GRP78) 。

Gene Ontology分析, 有10种蛋白已被确证定位于细胞外基质或是外分泌蛋白, 而另外9种蛋白在以往的分泌蛋白组学文献或血清中被检测出。19种蛋白中有9种蛋白存在糖基化修饰, 被确证为糖蛋白收录入Uniprot和GlycoSuiteDB糖蛋白数据库中, 有12种蛋白存在磷酸化修饰, 被确证为磷酸化蛋白收录入Uniprot和PhosphoSite磷酸化蛋白数据库中。有3种蛋白磷酸化修饰和糖基化修饰并存, 分别是桥粒芯糖蛋白2、角蛋白8和乳运铁蛋白。

3 讨论

化疗是肺癌综合治疗的重要手段之一, 其中微管类药物紫杉醇作用于构成细胞骨架的微管, 通过促进蛋白质组装成微管及阻止其解聚, 将肿瘤细胞阻遏在G₂期和M期, 从而抑制其有丝分裂, 最终导致肿瘤细胞死亡^[2]; 然而耐药性影响其疗效的发挥^[3]。如何有效的监控、克服以及预防紫杉醇耐药已成为目前临床研究的热点和难点问题。

随着肿瘤研究的不断深入, 有关细胞外基质蛋白的分泌蛋白组学研究亦引起人们的关注。已有的研究显示, 细胞外的粘附分子等参与了恶性的肿瘤和转移, 而目前愈来愈多的报道显示肿瘤微环境参与了肿瘤耐药^[5]。事实证明肿瘤微环境不仅可以导致肿瘤根治术后标准化疗的失败, 而且也促进了获得性化疗耐药的产生^[6]。但目前对于非小细胞肺癌 (NSCLC) 耐药与肿瘤微环境的关系研究较少, 肺癌中75%为非小细胞肺癌, 因此研究NSCLC与ECM凋亡耐药相关关系可能为它的治疗提供新的方向。

同时肺癌细胞中与耐药相关的分泌蛋白可能会随着癌细胞的异常增生而在血清中集聚, 使之成为一种可

以检测的肺癌标志物。由于分泌蛋白可直接从体液中筛查, 寻找途径方便, 具有微创性 or 无创性, 因此, 从癌细胞分泌蛋白角度筛选分子标志物, 可为肿瘤早期诊断和风险人物筛查提供科学依据, 而如果能从蛋白质组整体水平对耐药现象发生后的所有相关的肿瘤微环境中分泌蛋白进行研究和鉴定, 则对耐药机制的全面了解及临床用药的监控具有十分重要的意义。

我们应用差异凝胶电泳技术 (2D-DIGE) 和质谱技术对肺癌紫杉醇耐药相关的分泌蛋白进行研究, 其中差异凝胶电泳技术以其高敏感性和半定量的优势巧妙的解决了传统二维凝胶电泳的重复性问题, 使实验结果更加真实可靠。

应用DIGE进行分离后, 成功获得了蛋白质组分辨率高、重复性好的双向凝胶电泳图谱, MALDI-MS质谱成功鉴定出19种蛋白质, 其中16种蛋白质在耐药细胞中上调, 3种蛋白质点在耐药细胞中下调。Gene Ontology分析, 有10种蛋白已被确证定位于细胞外基质或是外分泌蛋白, 而另外9种蛋白在以往的分泌蛋白组学或血清标志物文献中所收录, 确证其在细胞培养液上清或血清中可检测到。所检测到的蛋白大部分存在糖基化或磷酸化的翻译后修饰, 体现在双向电泳图谱上为多个串珠状的结构, 而质谱鉴定结果则是体现了“蛋白质群”的现象, 即多个蛋白质点鉴定为同一种蛋白。

在鉴定的蛋白中, GSTP1是研究较多的引起耐药的一种关键性蛋白。GSTP1是肿瘤细胞和组织中最常见的同工酶, GSTP1过度表达增强了烷化剂等亲电性化疗药物的代谢, 使机体产生耐药性^[7]。醛脱氢酶是由多种同工酶构成的一组酶, 已有的研究发现某些肿瘤细胞对CTX的耐药性与ALDH基因表达密切相关。本实验发现在耐紫杉醇的肺癌细胞系中这两种酶表达亦明显增高, 推测其在紫杉醇耐药性的产生中亦起着关键作用。除此之外, 角蛋白8^[8]、组织蛋白酶D^[9]、乳酸脱氢酶B^[9]、糖调节蛋白78^[10]和磷酸甘油酸激酶1^[11]在以往的肿瘤耐药相关文献中亦有报道。而剩余的13种蛋白则为本研究首次发现其在肿瘤耐药系中异常表达。

此外, 我们的研究还发现了一系列细胞粘附分子、细胞因子、癌细胞分泌蛋白、外分泌酶类等耐药细胞中异常高表达, 如巢蛋白2、胰岛素样生长因子结合蛋白-1、三肽基肽酶 I 、组织蛋白酶D、乳酸脱氢酶B、基质金属蛋白酶7等。这说明由细胞接触、上皮细胞钙粘蛋白介导的细胞粘附作用在肺癌耐药方面作用显著, 而肿瘤微环境相关的物质, 如癌细胞分泌蛋白、细胞外基质

和一些可溶性因子(生长因子、激素)也会影响化疗的效果。此外,本次实验首次发现埃兹蛋白肺癌耐紫杉醇细胞系分泌蛋白中高表达,埃兹蛋白为一种膜细胞骨架连接蛋白,近年来众多研究发现其在多种肿瘤的发展、浸润和转移过程中扮演重要角色^[12-14]。而其在肿瘤耐药中的作用有望进一步研究。

本实验应用双向荧光凝胶电泳技术联合质谱鉴定技术分析紫杉醇耐药相关蛋白,发现了一系列在肺癌紫杉醇耐药细胞系中高表达的关键分子,这不仅有助于全面系统阐述肺癌耐药相关分子机制,更可以找到较为敏感的预测疗效的分子指标,为紫杉醇联合治疗提供更可行的理论依据,为个体化治疗奠定基础。

致谢

本课题的质谱鉴定工作由上海申康医学中心下设的瑞金医院血研所临床分子生物学科资源共享平台完成,在此深表谢意。

参考文献

- Herbst RS, Heymach JV, Lippman SM. Lung cancer. *N Engl J Med*, 2008, 359(13): 1367-1380.
- Jordan MA, Kamath K. How do microtubule-targeted drugs work? An overview. *Curr Cancer Drug Targets*, 2007, 7(8): 730-742.
- Yusuf RZ, Duan Z, Lamendola DE, *et al.* Paclitaxel resistance: molecular mechanisms and pharmacologic manipulation. *Curr Cancer Drug Targets*, 2003, 3(1): 1-19.
- Huang LJ, Chen SX, Huang Y, *et al.* Proteomics-based identification of secreted protein dihydrodiol dehydrogenase as a novel serum markers of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2006, 54(1): 87-94.
- Morin PJ. Drug resistance and the microenvironment: nature and nurture. *Drug Resist Updat*, 2003, 6(4): 169-172.
- Rintoul RC, Sethi T. The role of extracellular matrix in small-cell lung cancer. *Lancet Oncol*, 2001, 2(7): 437-442.
- Arai T, Miyoshi Y, Kim SJ, *et al.* Association of GSTP1 expression with resistance to docetaxel and paclitaxel in human breast cancers. *Eur J Surg Oncol*, 2008, 34(7): 734-738.
- Le Moguen K, Lincet H, Deslandes E, *et al.* Comparative proteomic analysis of cisplatin sensitive IGROV1 ovarian carcinoma cell line and its resistant counterpart IGROV1-R10. *Proteomics*, 2006, 6(19): S183-S192.
- Zhang JT, Liu Y. Use of comparative proteomics to identify potential resistance mechanisms in cancer treatment. *Cancer Treat Rev*, 2007, 33(8): 741-756.
- Hütter G, Sinha P. Proteomics for studying cancer cells and the development of chemoresistance. *Proteomics*, 2001, 1(10): 1233-1248.
- Chuthapisith S, Layfield R, Kerr ID, *et al.* Proteomic profiling of MCF-7 breast cancer cells with chemoresistance to different types of anti-cancer drugs. *Int J Oncol*, 2007, 30(6): 1545-1551.
- Ogino W, Takeshima Y, Mori T, *et al.* High level of ezrin mRNA expression in an osteosarcoma biopsy sample with lung metastasis. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2007, 29(7): 435-439.
- Li Q, Wu M, Wang H, *et al.* Ezrin silencing by small hairpin RNA reverses metastatic behaviors of human breast cancer cells. *Cancer Lett*, 2008, 261(1): 55-63.
- Torer N, Kayaselcuk F, Nursal TZ, *et al.* Adhesion molecules as prognostic markers in pancreatic adenocarcinoma. *J Surg Oncol*, 2007, 96(5): 419-423.

(收稿: 2009-03-04 修回: 2009-03-26)

(本文编辑 南娟)

· 启事 ·

文稿中须写成斜体的外文字符

在科技文稿中出现许多外文字符,它们有的是正体,有的是斜体。正体和斜体外文字符各有其特定含义和用法,切不可混淆使用。现根据有关规定和规则,把生物医学文稿中须要写成斜体的外文字符归纳为以下几类:

- ①生物学中拉丁学名的属名和种名(包括亚属、亚种、变种)应斜体,例如大肠杆菌*Escherichia coli*、幽门螺杆菌*Helicobacter pylori*。
- ②各种基因的缩写符号应斜体(基因表达产物缩写符号应写成正体),例如人脆性X智力低下基因1 *FMR1*、原癌基因*RAF1*(人)、病毒癌基因*V-RAF-1*(鼠)、抑癌基因*p53*(鼠)等。
- ③限制性内切核酸酶缩写符号中前3个字母应斜体,例如*Hind*Ⅲ、*Bam*H I、*Sal* I等。
- ④各种统计学符号应斜体,例如样本数*n*、*t*检验、*F*检验、概率*P*、相关系数*r*等。
- ⑤各种物理量符号应斜体(*pH*用正体除外),例如长度*L*、面积*A*(或*S*)、体积*V*、质量*m*、时间*t*、压力*p*、相对分子质量*M*、物质的量浓度*c*等。
- ⑥化学中表示旋光性、分子构型、构象、取代基位等符号应为斜体,例如左旋*L*-、右旋*D*-、邻位*o*-、对位*p*-、反位*trans*-、顺式*cis*-等。
- ⑦数学中用字母表示的变数和一般函数应斜体。
- ⑧英文中使用的某些拉丁词应斜体,例如*et al.*、*vs.*、*in situ*、*in vivo*、*in vitro*等。

《中国肺癌杂志》编辑部