

顺铂作用卵巢癌细胞株的蛋白质组学研究^{*}

李征宇^① 赵 霞^{①**} 杨金亮^② 魏于全^②

(四川大学 ① 华西第二医院妇产科; ② 华西医院人类疾病生物治疗国家重点实验室, 成都 610041)

摘要 应用蛋白质组学技术观察顺铂作用于人卵巢癌 SKOV3 细胞株后蛋白质分子的表达差异, 探讨蛋白质组学方法在化疗药物抗肿瘤作用机制研究方面的应用. 用顺铂(6 mg/mL)作用人卵巢癌 SKOV3 细胞 6 h, 分别收集实验组与对照组细胞, 裂解并提取细胞内总蛋白; 以固相 IPG 胶条(17 cm, pH4~7)为载体, 进行第一向等电聚焦和第二向 SDS-PAGE 电泳, 得到实验组与对照组双向电泳凝胶图; 经考马斯亮蓝染色后, 在 PDQuest 软件的辅助下进行实验组与对照组蛋白质表达的比较, 选择并切取明显差异点共 11 个, 经肽质量指纹谱(PMF)和串级质谱(MS/MS)分析, 检测出差异点中包含的主要蛋白. 通过质谱分析显示, 顺铂处理后表达明显上调的有原肌球蛋白家族、肌动蛋白家族、热休克蛋白 60(HSP60)、磷酸丙糖异构酶(TIM)家族等; 表达下调的有烯醇酶家族等. 这几类蛋白质多参与细胞内能量代谢、细胞形态维持、细胞转化凋亡等生理过程, 提示顺铂的抗肿瘤机制可能与此有关.

关键词 蛋白质组 顺铂 卵巢癌 双向电泳 质谱

卵巢癌是女性生殖器官常见恶性肿瘤之一, 发病率在生殖道恶性肿瘤中为第三位, 死亡率却居妇科恶性肿瘤首位, 5 年生存率仅有 19%~38.7%^[1]. 卵巢肿瘤发病隐匿, 早期诊断困难, 确诊时 70%已属临床晚期. 手术以后联合以铂类药物为基础的化疗已经成为晚期卵巢癌的主要治疗手段.

顺铂自 70 年代开始用于临床以来, 已成为治疗肺癌^[2]、食管癌^[3]、恶性淋巴瘤^[4]、卵巢癌^[5]等多种恶性肿瘤的一线化疗药物, 其抗癌谱广, 属细胞周期非特异性药物, 通过与 DNA 分子形成链内或链间交叉

链接或阻止 RNA 分子再复制等途径发挥抗肿瘤药理作用. 但大量临床实践发现, 长期使用顺铂也可能导致肿瘤耐药性的产生, 使化疗效果明显降低. 目前, 关于顺铂作用机制及耐药机制研究多限于核酸分子或个别蛋白质分子, 尚未从细胞蛋白质的整体水平上进行探讨.

蛋白质组学^[6]及其研究技术, 为我们深入认识细胞蛋白质整体水平上的改变提供了可能的途径. 目前研究表明一个基因能翻译多个蛋白质, 并能进行复杂的翻译后修饰, 执行不同的功能. 因此从蛋白质

2005-01-07 收稿, 2005-05-10 收修改稿

^{*} 国家自然科学基金(批准号: 30070835, 30070294)和国家“863”项目资助

^{**} 联系人, E-mail: zhaoxial@vip.sina.com

组学水平研究肿瘤对进一步认识肿瘤发病机理, 筛选肿瘤标记物及早期诊断、治疗和深入研究抗肿瘤药物作用机制与耐药机制等都有着积极的意义. 关于结肠癌^[7]、肝癌^[8]、肺癌^[9]、前列腺癌^[10]、卵巢癌等的蛋白质组学研究已经取得了一定进展. 与卵巢癌相关的蛋白质组学研究则主要集中于肿瘤分型、标记物筛选与蛋白质信息学^[11~16], 关于顺铂作用卵巢癌机制方面的蛋白质组学研究尚未见报道.

本实验拟从蛋白质组学水平观察顺铂作用卵巢癌细胞前后蛋白表达谱的变化, 探讨顺铂对人卵巢癌细胞的作用机制, 希望能从蛋白质组学角度进一步深化对顺铂抗肿瘤作用机制的认识.

1 材料与方法

1.1 材料

(1) 细胞及试剂: 人卵巢癌 SKOV3 细胞来自四川大学华西医院人类疾病生物治疗教育部重点实验室; 变性剂 UREA(尿素), 表面活性剂 CHAPS, 载体两性电解质 ampholyte, 还原剂 TBP(三丁基膦), 还原剂 DTT(二硫苏糖醇), Iodoacetamide(碘乙酰胺), SDS(十二烷基磺酸钠), Arc(丙烯酰胺), PDA(哌嗪双丙烯酰胺), TEMED(催化剂), APS(过硫酸胺), 矿物油, 低熔点琼脂糖, ReadyStrip™ IPG 胶条(7, 11, 17 cm)均购自 BIO-RAD 公司; 顺铂购自齐鲁制药厂.

(2) 主要仪器有 PROTEAN IEF 系统组件(BIO-RAD 公司); PROTEAN II xi 系统组件(BIO-RAD 公司); 4700TOF-TOF 质谱仪(ABI 公司); GS-800 校准型光密度扫描成像系统(BIO-RAD 公司)等.

(3) 主要溶液有细胞培养液(RPMI1640, 10%小牛血清, 0.01%硫酸阿米卡星); 细胞样品裂解液(8 M urea, 2 mmol/L TBP, 4% CHAPS, 0.2% ampholyte, 痕量溴酚蓝); 平衡缓冲液(36% urea, 2% SDS, 0.38 mmol/L Tris(pH 8.8), 20%甘油); 12%SDS-PAGE 凝胶缓冲液(12% Arc, 0.38 mmol/L Tris(pH 8.8), 0.1% SDS, 0.08% APS, 0.04% TEMED).

1.2 方法

(1) 样品制备: 当贴壁生长于RPMI1640 培养液中的人卵巢癌SKOV3 细胞处于生长对数期时, 将顺

铂以 6 $\mu\text{g/mL}$ ^[17]的浓度加入细胞培养液, 共同培养 6 h. 对照组加入等体积的 0.9%NaCl溶液. 胰蛋白酶消化细胞, 收集、洗涤、离心, $2000\times g$, 3 min. 每 10^7 细胞加入细胞样品裂解液 350 μL , 吹打混匀. 样品经超声(功率 80 W, 振幅 20 μm)后在冰浴中裂解作用 40~60 min, 经高速离心 $15000\times g$, 45 min后取上清, 采用Bradford法进行蛋白定量后 -80°C 保存.

(2) 胶条溶胀与水化: 17 cm 水化盘中加入 300 μL 样品裂解液, 将ReadyStrip™ IPG 胶条覆盖到液面上, 水化盘置于 PROTEAN IEF 电泳仪中, 被动水化, 20°C 过夜(>11 h).

(3) 第一向等电聚焦: 将充分溶胀的 IPG 胶条取出, 置于聚焦盘的相应聚焦槽中, 再将聚焦盘置于 PROTEAN IEF 电泳仪中, 进行等电聚焦. 程序设置如下:

S1	250 V	线性	30 min	除盐
S2	1000 V	快速	1 h	除盐
S3	10000 V	线性	5 h	升压
S4	10000 V	快速	60000 伏小时	聚焦
S5	500 V	快速	12 h	保持

(4) 第二向 SDS-PAGE: 取出聚焦好的 IPG 胶条, 经平衡缓冲液平衡以还原蛋白巯基, 移至预先灌注好的 12%SDS-PAGE 凝胶顶端, 与胶面完全接触, 将凝胶移至垂直电泳槽内. 起始电流为 10 mA/gel, 待样品完全走出 IPG 胶条, 加大电流至 30 mA/gel, 待指示剂达到底部边缘时停止电泳. 取出凝胶, 切角做记号.

(5) 图像扫描与分析: 凝胶经胶体考马斯亮蓝染色后, 使用 GS-800 校准型光密度扫描仪和 PHOTO-SHOP 7.0 软件对凝胶进行扫描成像. 在 PDQuest 双向电泳分析软件的辅助下, 对图像进行背景消减、斑点检测、匹配、获取斑点位置坐标等分析. 蛋白质点的量表示为该点的所有像素强度值的总和, 并将各点含量表示为相对含量, 即单个蛋白质点的量占该块胶内所有蛋白质点总量的百分数.

(6) 差异蛋白质点的选择: 实验共重复 3 次, 每次均采用相同实验条件, 以保证较好的可重复性. 实验组与对照组各选定一块“平均胶”作为基准胶. 所谓“平均胶”即通过对组内各块凝胶进行匹配分析, 蛋白

质点显示比较均匀, 杂质斑点少, 最能体现该组蛋白质分布状态的一块凝胶. 差异蛋白质点的选择借助图像分析软件, 以平均胶为基准, 参考其他胶, 选择组间表达差异明显, 组内表达含量稳定、位置恒定的点作为目标点. 为减少差异点选择的假阳性率, 以蛋白质斑点表达的“有或无”作为选择标准. 确定差异点后在凝胶上切取相应的点, 去离子水洗涤, 甲醇固定, -80°C 冻干保存.

(7) 蛋白质分子的检测: 采用肽质量指纹谱(PMF)和串联质谱(MS/MS)分析方法对分离的蛋白质分子进行鉴定, 其步骤包括脱色、酶切、肽提取. 离子源为基质辅助激光解吸离子化源(MALDI 源); 基质为 5 mg/mL 的 CHCA(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid), 0.1%TFA 的含 50%乙腈的水溶液; 加速电压: PMF 20 kV, MS/MS 8 kV. 蛋白质的鉴定、质谱打分结果和肽段匹配信息等由 GPS 以 MASCOT 为搜索引擎在 NCBI 数据库检索(www.matrixscience.com).

2 结果

2.1 双向电泳凝胶图

实验共重复 3 次, 顺铂 6 $\mu\text{g/mL}$ 作用卵巢癌 SKOV3 细胞 6 h 后的实验组与对照组分别得到 3 幅双向电泳凝胶图, 以平均胶为参考标准, 凝胶图像匹配率分别为 90.5%(实验组)和 88.4%(对照组). 目前认为, 凝胶图像匹配率在 75%以上即可判定图像重复性较好. 图 1 为实验组与对照组的“平均胶”凝胶图. 由 PHOTOSHOP 7.0 软件和 PDQuest 双向电泳分析软

件编辑, 以“有或无”为判定标准, 共选择出表达明显差异的斑点 11 个, 标记为 A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K. 各差异点比较显示如图 2~7.

2.2 质谱分析结果

质谱分析结果如表 1; 部分差异点蛋白质 PMF 质谱图如图 8~13.

(1) 实验组与对照组相比较, 经顺铂处理后, 表达明显上调的蛋白有: 原肌球蛋白(tropomyosin)家族, 包括 tropomyosin 3, tropomyosin 4, tropomyosin isoform 等; 肌动蛋白(actin)家族, 包括 beta actin, mutant-beta actin 等; 热休克蛋白 60(HSP60); 磷酸丙糖异构酶(TIM, triosephosphate isomerase)家族; 其他, 如 moesin 等. 表达下调的蛋白主要有: 烯醇酶(enolase)家族, 包括 enolase 1, 2-phosphopyruvate-hydratase alpha-enolase 等.

(2) 某些点中混杂有少量其他蛋白, 相对分子量与等电点具有相似性, 但丰度较低.

3 讨论

应用蛋白质组学技术, 可从整体上定性和定量检测分析肿瘤细胞经化疗药物作用前后细胞内蛋白质分子的变化, 对在蛋白质水平进一步探讨药物作用机制及耐药机制的产生及寻找新药靶点有重要意义, 但目前这方面的研究还比较少. Poirier 等人^[18]比较 azacytidine 作用 Burkitt 淋巴瘤细胞前后的蛋白表达谱, 发现处理后的细胞增殖能力减弱, 转二羟丙酮

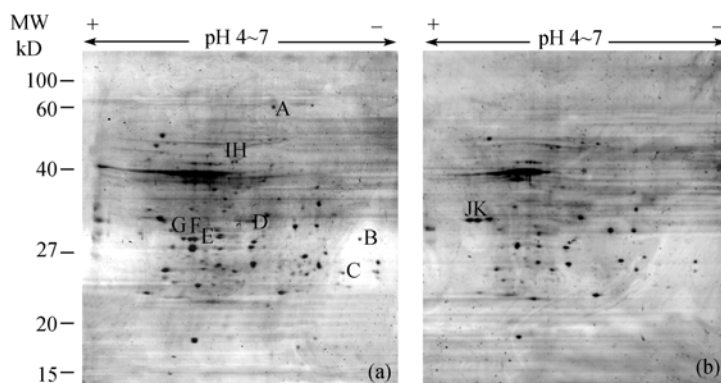


图 1 6 $\mu\text{g/mL}$ 实验组((a))和对照组((b))

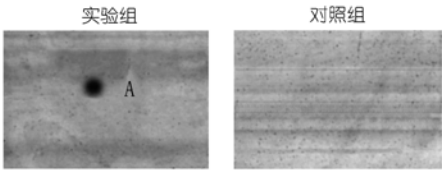


图 2 实验组 A 点(HSP60), 在对照组相应位置未见明显表达

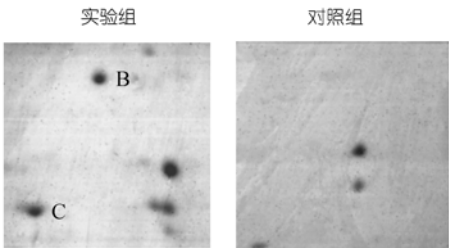


图 3 实验组 B 点(unknown protein), C 点(TIM 1), 在对照组相应位置未见明显表达

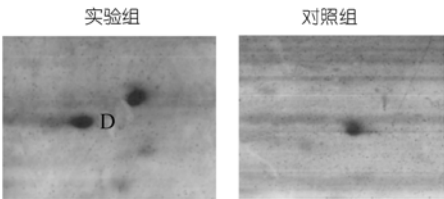


图 4 实验组 D 点(moesin), 在对照组相应位置未见明显表达

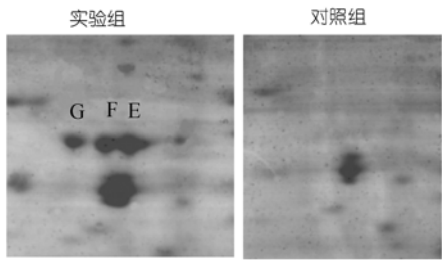


图 5 实验组 E 点(tropomyosin isoform), F 点(tropomyosin 3), G 点(tropomyosin 4), 在对照组相应位置未见明显表达

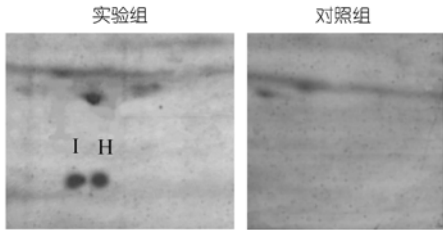


图 6 实验组 H 点(beta actin), I 点(mutant-beta actin), 在对照组相应位置未见明显表达

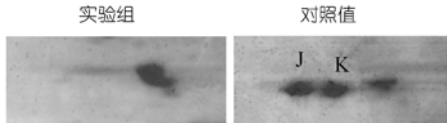


图 7 对照组 J 点(enolase 1), K 点(2-phosphopyruvate-hydratase alpha-enolase), 在实验组相应位置未见明显表达

表 1 蛋白质质谱分析结果

蛋白点	序号	分子量	等电点	描述	质谱打分	肽段匹配率
A	gi 129379	61016	5.7	热休克蛋白 60(HSP60)	124	38%
B	gi 14603170	38959	6.79	未知蛋白(unknown protein for MGC:19787)	143	25%
C	gi 4507645	26652	6.45	磷酸丙糖异构酶-1(TIM 1)	339	56%
D	gi 4505257	67777	6.08	moesin	141	24%
E	gi 9508585	28937	4.79	原肌球蛋白异构体(tropomyosin isoform)	530	41%
F	gi 24119203	29014	4.75	原肌球蛋白 3(tropomyosin 3)	370	60%
G	gi 4507651	28504	4.67	原肌球蛋白 4(tropomyosin 4)	451	62%
H	gi 4501885	41709	5.29	β 肌动蛋白(beta actin)	215	32%
I	gi 28336	41785	5.22	突变型 β 肌动蛋白(mutant-beta actin)	154	32%
J	gi 930063	47139	7.01	烯醇酶-1(enolase 1)	395	61%
K	gi 182118	47079	7.01	2-磷酸丙酮酸水合酶 α 烯醇酶 (2-phosphopyruvate- hydratase alpha-enolase)	264	51%

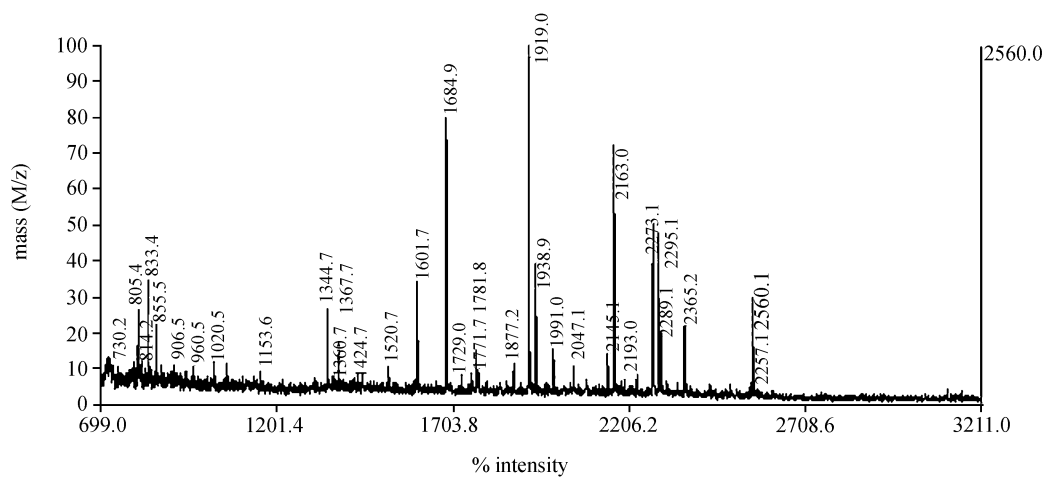


图 8 A 点 PMF 质谱图

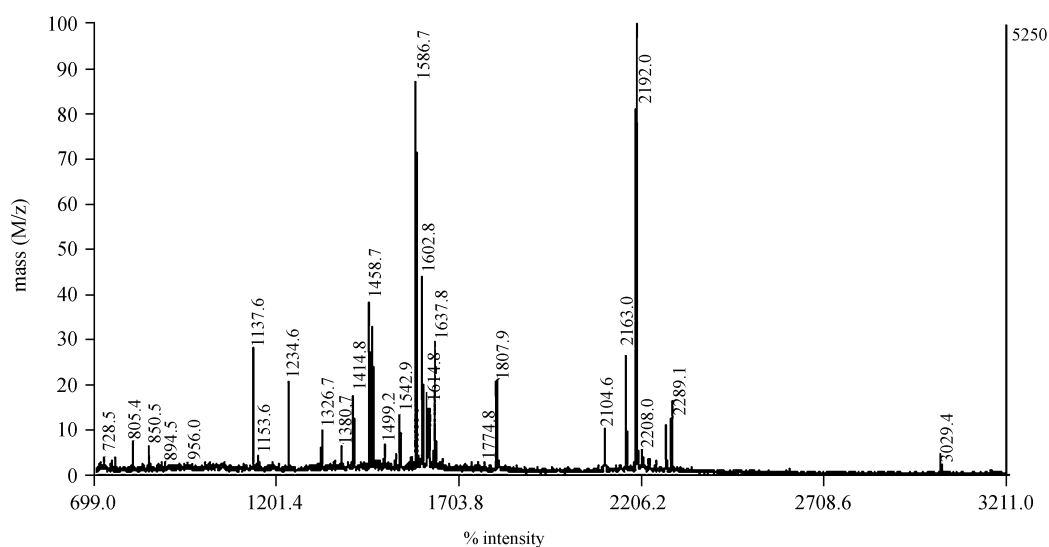


图 9 C 点 PMF 质谱图

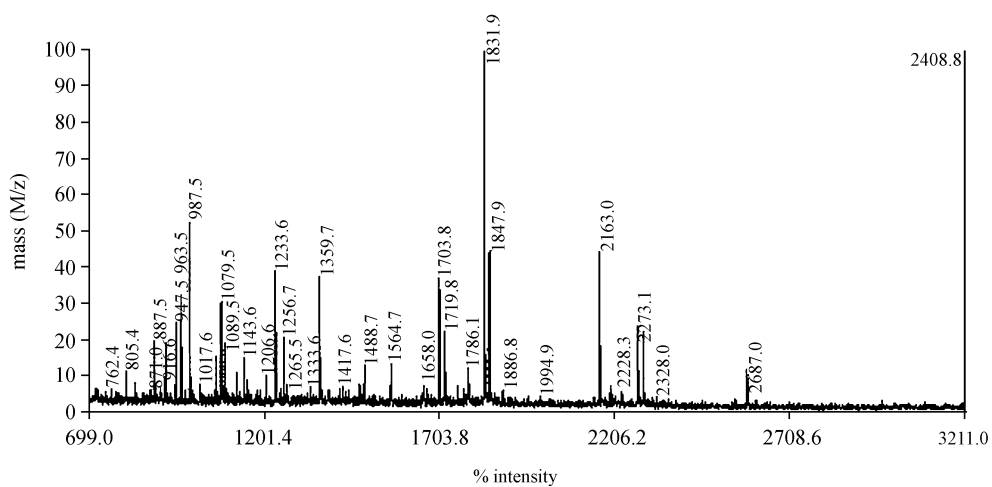


图 10 D 点 PMF 质谱图

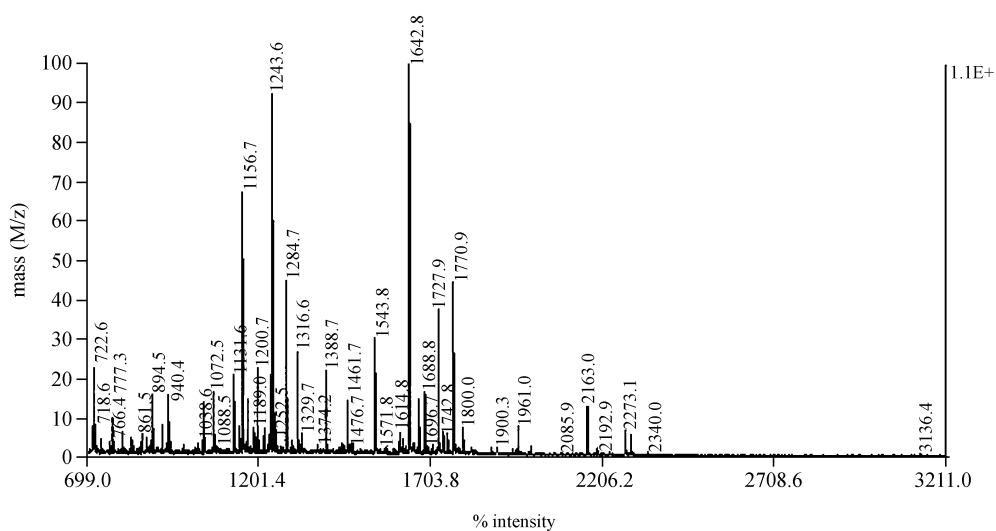


图 11 E 点 PMF 质谱图

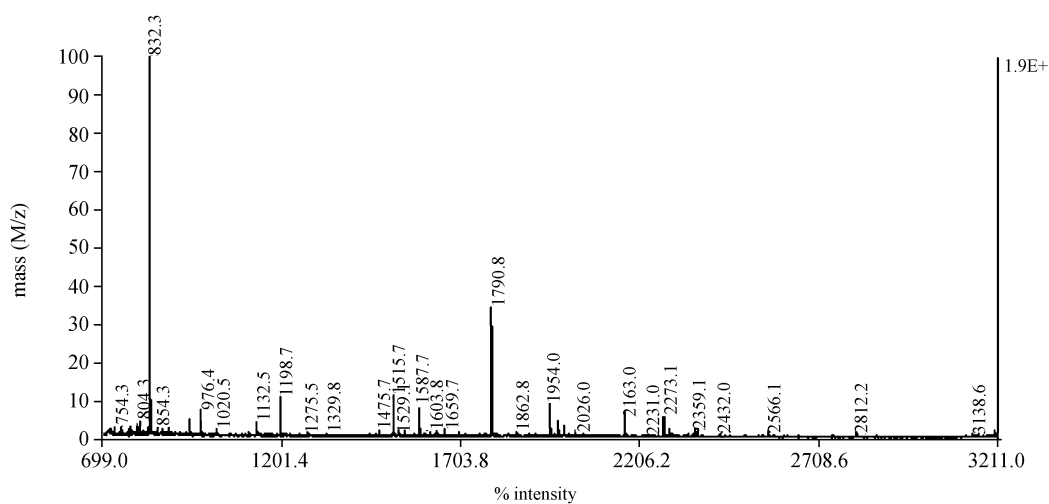


图 12 H 点 PMF 质谱图

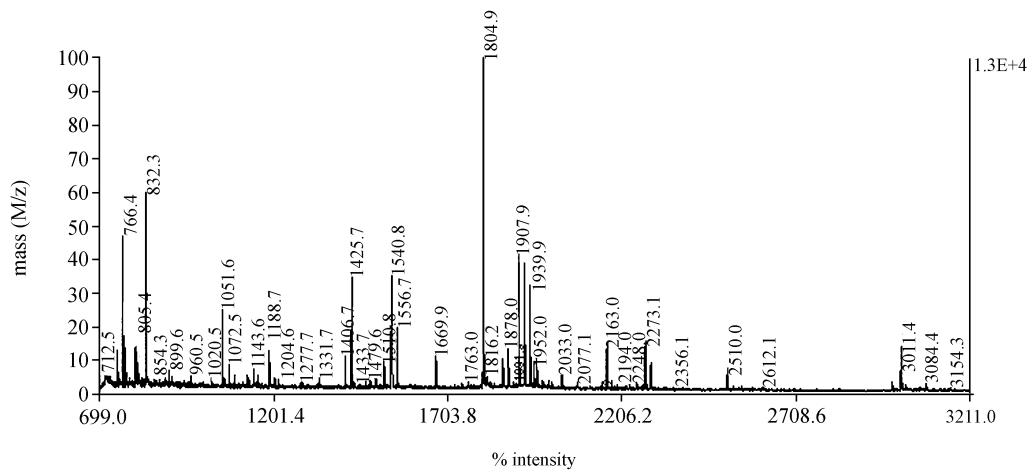


图 13 J 点 PMF 质谱图

基酶、微管蛋白折叠辅因子、caspase 等 14 种蛋白质上调, 21 种蛋白质表达下调。上调蛋白质的功能与细胞骨架结构、细胞能量代谢、细胞活力和蛋白质合成有关。Sinha 等人^[19]研究了人类黑素瘤 Mewo 细胞系和长春地辛等药物诱导的耐药株, 通过双向电泳发现了 4 种新的与耐药有关的蛋白质, 它们的高表达干扰 chaperone 系统, 影响转录机制。

顺铂是目前临床治疗恶性肿瘤的常用化疗药物, 抗癌谱广。研究发现顺铂属细胞周期非特异性药物, 通过与 DNA 分子形成链内或链间交叉联接或阻止 RNA 分子再复制等途径发挥抗肿瘤药理作用, 其耐药性则与 P 糖蛋白(P-gp)和 mdr-1 基因过度表达^[20], 谷胱甘肽 S-转移酶活性增加^[21], 拓扑异构酶活性降低^[22], 及 P53 表达水平下降、bcl-2 表达水平升高^[23]等有关。但是这些关于顺铂抗肿瘤作用机制与耐药机制研究都限于个别基因或蛋白质分子, 在蛋白质组学水平, 相关研究目前尚未见报道。

本研究应用蛋白质组学技术观察了顺铂作用卵巢癌细胞引起细胞蛋白质表达变化的情况, 实验中用顺铂浓度为 6 $\mu\text{g/mL}$, 与临床化疗时人体血药浓度峰值相当, 可诱导细胞凋亡, 但不会引起明显的 DNA 裂解^[17]。我们用顺铂 6 $\mu\text{g/mL}$ 作用卵巢癌 SKOV3 细胞 6 h, 提取细胞总蛋白, 经双向电泳与质谱分析, 发现经顺铂作用后, 可使原肌球蛋白家族、肌动蛋白家族、热休克蛋白 60(HSP60)、磷酸丙糖异构酶(TIM)家族等表达上调; 而烯醇酶家族等表达下调。这几类蛋白质参与了细胞能量代谢、微管系统构成及细胞转化等生理过程。

目前研究认为原肌球蛋白是一种细胞转化抑制因子, 对肿瘤的抑制效应与诱导肿瘤细胞 anoikis(分散诱导凋亡)有关^[24], 而其表达的下降是肿瘤发生过程中细胞转化的重要特征并具有临床早期诊断意义。由于原肌球蛋白与肌动蛋白是构成细胞骨架的重要成分, 参与细胞形态维持、细胞物质运输、细胞运动收缩、轴突树突伸展等生命活动, 提示顺铂的药物作用靶点与耐药性的产生可能与这两类蛋白作用有关, 如破坏细胞骨架微管结构等。而卵巢癌细胞顺铂敏感株与耐药株之间原肌球蛋白的表达水平差异^[25]也可为这一设想提供支持依据。蛋白质组学研究发现

膀胱移行细胞癌细胞中原肌球蛋白表达明显下调, 但抑制有丝分裂原活化蛋白激酶途径可增加其表达^[26], 关于乳腺癌和口腔舌癌的研究也得到类似结果^[24,27]。运用高通量蛋白质组技术对乳腺癌细胞的检测, 则发现 β 肌动蛋白等表达变化^[28]。急性淋巴白血病长春新碱敏感株与耐药株的蛋白质组比较中也发现包括肌动蛋白在内的 10 种蛋白存在差异, 其中大部分与细胞骨架构成有关^[29]。

磷酸丙糖异构酶是参与糖酵解途径的酶之一, 催化磷酸二羟丙酮与 3-磷酸甘油醛之间的转变, 在细胞能量代谢过程中发挥作用。在关于肾细胞癌与肺癌的蛋白质组研究中发现此酶的表达明显升高^[30,31]。而顺铂作用也会引起卵巢癌细胞内此酶的表达增强, 提示此蛋白在肿瘤发生与药物抗肿瘤机制中的作用尚需进一步探索。

烯醇酶也是参与糖酵解途径的酶之一, 催化 2-磷酸甘油酸脱水生成磷酸烯醇型丙酮酸, 在能量代谢过程中发挥作用。在关于乳腺癌、肝内胆管癌、小细胞肺癌的蛋白质组研究中发现肿瘤细胞中此酶表达上调^[29,32,33], 具有一定临床意义, 可作为肺癌、黑色素瘤等早期诊断与预后评价的标记物。顺铂作用会降低癌细胞内烯醇酶的表达水平, 提示顺铂的抗肿瘤机制可能与下调肿瘤细胞内能量代谢有关。

我们的研究结果显示顺铂作用卵巢癌细胞在蛋白质水平可引起多种分子的表达变化。原肌球蛋白、肌动蛋白、磷酸丙糖异构酶、烯醇酶等表达水平的改变可能通过干扰细胞内能量代谢、细胞骨架结构及形态、细胞转化凋亡等生理过程, 影响肿瘤细胞的生长, 而这也正是顺铂抗肿瘤的作用靶点。因此, 本文为进一步研究顺铂在蛋白质分子水平的抗肿瘤作用机制提供了新的证据。

参 考 文 献

- 1 Hoskins W J, McGuire W P, Brady M F, et al. The effect of diameter of largest residual disease on survival after primary cytoreductive surgery in patients with suboptimal residual epithelial ovarian carcinoma. *Am J Obstet Gynecol*, 1994, 170: 974~979
- 2 Yoshimura N, Kudoh S, Mukohara T, et al. Phase I/II study of cisplatin combined with weekly paclitaxel in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*, 2004, 90: 1184~1189 [DOI]

- 3 Polee M B, Hop W C, Kok T C, et al. Prognostic factors for survival in patients with advanced oesophageal cancer treated with cisplatin-based combination chemotherapy. *Br J Cancer*, 2003, 89: 2045~2050 [\[DOI\]](#)
- 4 Wong S F, Lindgren T, Hsu D, et al. Low-dose gemcitabine plus cisplatin in previously treated, relapsed non-Hodgkin's lymphoma. *Am J Hematol*, 2003, 73: 298. [\[DOI\]](#)
- 5 Bookman M A, Greer B E, Ozols R F. Optimal therapy of advanced ovarian cancer: carboplatin and paclitaxel vs. cisplatin and paclitaxel (GOG158) and an update on GOG 182-ICON5. *Int J Gynecol Cancer*, 2003, 13: 735~740 [\[DOI\]](#)
- 6 Wasinger V C, Cordwell S J, Cerpa-Poljak A, et al. Progress with gene-product mapping of the mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*, 1995, 16: 1090~1094 [\[DOI\]](#)
- 7 Stulik J, Hemychova L, Porkertova S, et al. Proteome study of colorectal carcinogenesis. *Electrophoresis*, 2001, 22: 3019~3025 [\[DOI\]](#)
- 8 Ou K, Seow T K, Liang R C, et al. Proteome analysis of a human hepatocellular carcinoma cell line, HCG-M, an update. *Electrophoresis*, 2001, 22: 2804~2811 [\[DOI\]](#)
- 9 Yanagisawa K, Shyr Y, Xu B J, et al. Proteomic patterns of tumor subsets in non-small cell lung cancer. *Lancet*, 2003, 362: 433~439. [\[DOI\]](#)
- 10 Alaiya A, Roblick U, Egevad L, et al. Polypeptide expression in prostate hyperplasia and prostate adenocarcinoma. *Anal Cell Pathol*, 2000, 21: 1~9
- 11 Stevens E, Liotta L A, Kohn E C, et al. Proteomic analysis for early detection of ovarian cancer: a realistic approach? *Int J Gynecol Cancer*, 2003, 13(2): 133~139 [\[DOI\]](#)
- 12 Ardekani A M, Liotta L A, Petricoin E F, et al. Clinical potential of proteomics in the diagnosis of ovarian cancer. *Expert Rev Mol Diagn*, 2002, 2(4): 312~320 [\[DOI\]](#)
- 13 Petricoin E F, Ardekani A M, Hitt B A, et al. Use of proteomics patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet*, 2002, 359 (9306): 572~577 [\[DOI\]](#)
- 14 Ye B, Cramer D W, Skates S J, et al. Haptoglobin-alpha subunit as potential serum biomarker in ovarian cancer: identification and characterization using proteomic profiling and mass spectrometry. *Clinical Cancer Research*, 2003, 9(8): 2904~2911
- 15 Jones M B, Krutzsch H, Shu H, et al. Proteomics analysis and identification of new biomarkers and therapeutic targets for invasive ovarian cancer. *Proteomics*, 2002, 2(1): 76~84 [\[DOI\]](#)
- 16 Nishikuza S, Chen S T, Gwady F G, et al. Diagnostic markers that distinguish colon and ovarian adenocarcinomas: identification by genomic, proteomic, and tissue array profiling. *Cancer Research*, 2003, 63(17): 5243~5250
- 17 Ormerod M G, Oneill C F, Robertson D, et al. Cisplatin induces apoptosis in a human ovarian carcinoma cell line without concomitant internucleosomal degradation of DNA. *Exp Cell Res*, 1994, 211(2): 231~237 [\[DOI\]](#)
- 18 Poirier F, Ponter M, Labas V, et al. Two-dimensional database of a Burkitt lymphoma cell line (DG75) proteins: protein pattern changes following treatment with 5-azacytidine. *Electrophoresis*, 2001, 22(9): 1867~1877 [\[DOI\]](#)
- 19 Sinha P, Kohl S, Fischer J, et al. Identification of novel proteins associated with the development of chemoresistance in malignant melanoma using two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 2000, 21(14): 3048~3057 [\[DOI\]](#)
- 20 Yin M B, Guo B, Voigt W, et al. Novel cellular determination for reversal of multidrug resistance in cells expressing of p170- glycoprotein. *Biochem Biophys Acta*, 1998, 1401: 265~276 [\[DOI\]](#)
- 21 Cullen K J, Newkirk K A, Schumaker L M, et al. Glutathione S-transferase pi amplification is associated with cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma cell lines and primary tumors. *Cancer Res*, 2003, 63: 8097~8102
- 22 Dingemans A C, Van A J, Span S, et al. Topoisomerase II alpha and other drug resistance markers in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2001, 32: 117~128 [\[DOI\]](#)
- 23 Gregorc V, Ludovini V, Pistola L, et al. Relevance of p53, bcl-2 and Rb expression on resistance to cisplatin-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2003, 39: 41~48 [\[DOI\]](#)
- 24 Raval G N, Bharadwaj S, Levine E A, et al. Loss of expression of tropomyosin-1, a novel class II tumor suppressor that induces anoikis, in primary breast tumors. *Oncogene*, 2003, 22(40): 6194~6203 [\[DOI\]](#)
- 25 Deng H B, Parekh H K, Chow K C, et al. Increased expression of dihydroadiol dehydrogenase induces resistance to cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem*, 2002, 277(17): 15035~15043 [\[DOI\]](#)
- 26 Pawlak G, McGarvey T W, Nguyen T B, et al. Alterations in tropomyosin isoform expression in human transitional cell carcinoma of the urinary bladder. *Int J Cancer*, 2004, 110(3): 368~373 [\[DOI\]](#)
- 27 He Q Y, Chen J, Kung H F, et al. Identification of tumor-associated proteins in oral tongue squamous cell carcinoma by proteomics. *Proteomics*, 2004, 4(1): 271~278 [\[DOI\]](#)
- 28 Somiari R I, Sullivan A, Russell S, et al. High-throughput proteomic analysis of human infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Proteomics*, 2003, 3(10): 1863~1873 [\[DOI\]](#)
- 29 Verrills N M, Walsh B J, Cobon G S, et al. Proteome analysis of vinca alkaloid response and resistance in acute lymphoblastic leukemia reveals novel cytoskeletal alterations. *J Biol Chem*, 2003, 278(46): 45082~45093 [\[DOI\]](#)
- 30 Lichtenfels R, Kellner R, Atkins D, et al. Identification of metabolic enzymes in renal cell carcinoma utilizing PROTEOMEX analyses. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1646(1-2): 21~31
- 31 Chen G, Gharib T G, Huang C C, et al. Proteomic analysis of lung adenocarcinoma: identification of a highly expressed set of proteins in tumors. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(7): 2298~2305
- 32 Srisomsap C, Sawangaretrakul P, Subhasitanont P, et al. Proteomic analysis of cholangiocarcinoma cell line. *Proteomics*, 2004, 4(4): 1135~1144 [\[DOI\]](#)
- 33 Peebles K A, Duncan M W, Ruch R J, et al. Proteomic analysis of a neoplastic mouse lung epithelial cell line whose tumorigenicity has been abrogated by transfection with the gap junction structural gene for connexin 43, Gja1. *Carcinogenesis*, 2003, 24(4): 651~657 [\[DOI\]](#)