

文章编号:1674-2869(2019)03-0205-08

基于 iTRAQ 技术的肝癌肝郁证唾液蛋白质组学

丁 峰^{1,2,3}, 孙珂煊^{1,2,3}, 曹美群^{2,3}, 吴正治^{*2,3}

1. 暨南大学中西医结合博士后流动站, 广东 广州 510632;

2. 深圳市老年医学研究所, 广东 深圳 518029;

3. 深圳市第二人民医院, 广东 深圳 518029

摘 要:通过同位素标记相对和绝对定量(iTRAQ)技术分析原发性肝癌不同中医证型的差异蛋白表达谱,拟从唾液蛋白质水平阐述原发性肝癌肝郁证的证候本质。共收集肝癌证肝郁患者、非肝郁证肝郁患者以及健康对照组唾液样本各11例。在3组人群共鉴定1 296个蛋白;与健康对照组比较,肝郁证组和非肝郁证组分别有390和231个显著差异表达蛋白(差异倍数>1.5或<0.67, p 值<0.05)。进一步比较肝郁证组和非肝郁证组的差异蛋白,发现260个蛋白在肝郁证组中特异性表达,包括124个上调蛋白和136个下调蛋白。GO功能分类和KEGG通路分析表明,肝郁证组中特异表达蛋白主要涉及蛋白酶体通路、溶酶体通路、黏附连接通路等。建立了肝郁证肝癌特异的蛋白数据库,筛选出与肝郁证肝癌发生发展可能相关的多个差异蛋白。

关键词:肝癌;肝郁证;唾液;差异表达蛋白;代谢通路;iTRAQ技术

中图分类号:Q48 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1674-2869.2019.03.001

Salivary Proteomics of Liver Cancer with Liver-Depression Syndrome Using iTRAQ Techniques

DING Feng^{1,2,3}, SUN Kehuan^{1,2,3}, CAO Meiqun^{2,3}, WU Zhengzhi^{*2,3}

1. Integrated Chinese and Western Medicine Postdoctoral Research Station, Jinan University, Guangzhou 510632, China;

2. Shenzhen Geriatric Research Institute, Shenzhen 518029, China;

3. Shenzhen Second People's Hospital, Shenzhen 518035, China

Abstract: The aim of this study is to explore the pathogenesis of hepatocellular carcinoma (HCC) with liver-depression syndrome from the level of salivary protein by analyzing the protein expression profiles of different TCM syndromes of primary HCC with isobar labeled relative and absolute quantitation (iTRAQ) techniques. Eleven saliva samples from HCC patients with liver-depression syndrome, HCC patients without liver-depression syndrome, and healthy controls were collected, respectively. A total of 1 296 proteins were identified among all three groups. Compared with the healthy control group (fold change >1.5 or <0.67 and p value <0.05), 390 differentially expressed proteins were detected in HCC patients with liver-depression syndrome and 231 differentially expressed proteins were detected in HCC patients without liver-depression syndrome. Further comparison between the two groups reveals that 260 proteins are specifically expressed in HCC patients with liver-depression syndrome, including 124 up-regulated and 136 down-regulated proteins. Gene Ontology functional classification and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathway analysis show that these proteins are mainly involved in proteasome pathways, lysosomal pathways and adhesion pathways. We established the differentially expressed protein database for HCC with liver-depression syndrome. The multiple differentially expressed proteins that might be related to the pathogenesis of HCC were identified.

Keywords: liver cancer; liver-depression syndrome; saliva; differentially expressed proteins; pathway; iTRAQ techniques

收稿日期:2019-03-18

作者简介:丁 峰,博士。E-mail:35508421@qq.com

*通讯作者:吴正治,博士,教授,博士研究生导师。E-mail:szwzz001@163.com

引文格式:丁峰,孙珂煊,曹美群,等.基于 iTRAQ 技术的肝癌肝郁证唾液蛋白质组学[J].武汉工程大学学报,2019,41(3): 205-212.

原发性肝癌(以下简称肝癌)是临床上常见的恶性肿瘤之一。世界卫生组织发布的《全球癌症统计报告 2018》指出,中国是世界上癌症发病率和死亡率全球第一的国家^[1]。中国肝癌的发病率和死亡率均位列全国第五,每年我国死于肝癌的患者约为 40 万人,而且近年来我国的肝癌患者数量仍在逐渐增加。原发性肝癌临床上表现为为肝痛、乏力、纳差、发热、消瘦、黄疸等。中医认为肝郁证为肝癌临床常见的证型之一^[2],然而目前对肝郁证肝癌的研究进行的较少,其本质尚不明确。

近年来,唾液组学在口腔疾病和全身系统性疾病早期诊断领域备受关注^[3-6]。与血清标本相比,唾液具有取样方便、安全无创伤、成本低廉等优点。因此,唾液在人体疾病早期诊断和预后监测中具有巨大的潜力。随着基因表达芯片、高通量测序技术、生物质谱等具有高灵敏度、高通量、高分辨率新技术的快速发展,研究人员已经在唾液中发现了多种临床疾病的诊断标志物。然而目前的研究领域主要集中在口腔癌、头颈癌、胃癌、肺癌、乳腺癌等疾病^[7-9]。国内外对肝癌早期诊断的研究主要基于血清和肝脏组织^[10-12],对肝癌唾液组学的研究还比较少见。本文采用同位素标记相对和绝对定量(isobar labeled relative and absolute quantitation, iTRAQ)技术,对肝癌不同中医证型进行唾液蛋白质谱分析,筛选肝郁证肝癌相关蛋白,从蛋白质组学角度探讨肝郁证肝癌的发病机制。

1 实验部分

1.1 诊断标准

1.1.1 西医诊断标准 原发性肝癌的诊断及分期参照 2001 年第八届全国肝癌学术会议制定并通过的原发性肝癌临床诊断与分期标准^[13]。

1.1.2 中医辨证分型标准 在确定西医临床诊断为原发性肝癌的基础上,参照文献研究得出的肝郁证参考诊断标准:①胸胁作胀或痛,②精神抑郁,③烦躁易怒,④口苦,⑤胸闷,⑥善太息,⑦脉弦。以上 7 条同时具备 4 条或 4 条以上即可诊断为肝郁证^[14]。未见以上症状者纳入非肝郁证组。

1.2 排除标准

排除年龄在 30 岁以下;排除已接受过局部放化疗治疗或手术者;排除患有口腔局部及唾液腺炎症患者;排除合并有其他系统严重原发性疾病患者;排除患有舍格伦综合征或囊性纤维病患者。

1.3 唾液样本

本次所收集的唾液样本均来自湖南中医药大

学第一附属医院肿瘤科临床诊断为肝癌的患者,患者均签署知情同意书。其中,肝郁证肝癌患者 11 例,男 9 例,女 2 例,平均年龄 50.4 岁,最大患者 65 岁,最小患者 42 岁。非肝郁证肝癌患者 11 例,男 8 例,女 3 例,平均年龄 57.6 岁,最大患者 67 岁,最小患者 40 岁。健康对照组 11 例,男 5 例,女 6 例,平均年龄 53.2 岁。

1.4 唾液样本收集及处理

1.4.1 唾液样本采集 样本采集前一晚,患者睡前清水漱口 3 次,避免进任何食物或药物。第二天早上起床后未进食前,采用非刺激性唾液采集方式取样。患者将前 5 min 内的唾液自然吞下后,专业人员开始操作收集唾液样本。将消毒的无菌圆柱形棉花放入患者口中,当棉花积聚足够量的唾液后,让患者将棉花吐出提前置于冰浴的唾液离心管(15 mL)内。4 ℃下先静置 1 h,然后 3 000 r/min 离心 10 min。冰浴上将收集的唾液分装在 1 mL 的 EP(eppendorf)管中,每管分装 200 μL,置于-80 ℃冰箱冷冻保存。

1.4.2 唾液蛋白提取及定量 取出样本,冰上解冻,样本中加入适量裂解液(由 2 mol/L 硫脲,7 mol/L 尿素和质量分数 0.1%chaps {3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基[丙磺酸内盐,3-[(3-cholamidopropyl) dimethy lammonio] propanes ulfonate} 组成,涡旋混匀后超声 60 s,在室温提取 30 min。在 4 ℃下 15 000 r/min 离心 20 min,收集上清,分装后置于-80 ℃冰箱保存。采用 Bradford 法对提取的蛋白进行定量,蛋白定量后分别将肝郁证组、非肝郁证组、健康对照组各 11 例样本进行组内混合(每个样本取等量蛋白混合)。每组混合后平均分为两份,共 6 份。

1.4.3 蛋白酶切 分别从 6 组样本蛋白溶液中取出 100 μg 蛋白于离心管中,加入 4 μL 还原试剂 60 ℃反应 1 h,加入 2 μL Cysteine Blocking Reagent,室温反应 10 min。往 10K 的超滤管中加入还原烷基化后的蛋白溶液,12 000 r/min 离心 20 min,收集上清。加入 100 μL 溶解液,12 000 r/min 离心 20 min,并收集上清。在超滤管中加入 2 μg 胰蛋白酶 37 ℃反应过夜;次日 12 000 r/min 离心 20 min,收集酶解消化后的肽段溶液。超滤管中加入 50 μL 溶解液离心 20 min,与上一步合并,共得到 100 μL 酶解后的样品。

1.5 iTRAQ 实验

1.5.1 iTRAQ 标记 每管 iTRAQ 试剂中分别加入 150 μL 异丙醇,涡旋振荡后离心。取 50 μL 样品转移到新的离心管中,对 6 份肽段混合物进行

iTRAQ 标记,并等量混合。将标记后的样品涡旋振荡后离心,进行真空冷冻离心干燥后-80℃保存。

1.5.2 LC-MS/MS 分析 用 100 uL 流动相 A 溶解 iTRAQ 标记后的样品,14 000 r/min 离心 20 min,收集上清液。用 400 μg 酶解好的牛血清白蛋白(albumin from bovine serum,BSA)进行分离(柱温 45℃,检测波长 214 nm)。取 100 uL 准备好的样本上样,流速 0.7 mL/min。用 20 μL 质量分数 2% 甲醇,质量分数 0.1% 甲酸复溶高 pH 反相分离得到的组份,12 000 r/min 离心 10 min,收集上清上样,采取夹心法上样,上样体积 10 μL,分离流速 350 nL/min。

1.5.3 质谱数据处理 搜库所用数据库为 UNIPROT Human 数据库,并由 MALDI-TOF-TOF 4700 型质谱完成质谱分析。质谱原始文件采用 AB Sci-ex 配套商用软件 Protein Pilot 进行处理。

1.6 生物信息学分析

本研究鉴定的差异蛋白采用差异倍数>1.5 或 <0.67,以及 *p* 值<0.05 作为筛选标准。通过 DAVID^[15] 数据库对鉴定得到的显著差异表达蛋白进行 Gene Ontology(GO)功能注释。GO 功能分类包括三大类:生物学过程(Biological Process)、分子功能(Molecular Function)以及细胞组分(Cellular Component)。同时,利用 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)数据库进行差异蛋白代谢通路富集分析。进一步应用 STRING 蛋白相互作用网络数据库(<https://string-db.org/>)绘制差异蛋白相互作用网络图谱。

2 结果与讨论

2.1 差异表达蛋白鉴定

健康对照组、肝郁组、非肝郁组(每组 2 个重复)共 6 组,经 iTRAQ 标记串联质谱分析后,共同鉴定到的蛋白有 1 296 个。以差异倍数>1.5 或 <0.67 为筛选标准,与健康对照组相比,肝郁组中具有显著差异表达的蛋白 390 个,其中显著上调的差异蛋白有 201 个,显著下调的差异蛋白有 189 个;非肝郁组中具有显著差异表达的蛋白 231 个,其中显著上调的差异蛋白有 133 个,显著下调的差异蛋白有 98 个。同时,对肝郁组和非肝郁组差异蛋白进行比较分析,得到在两组中同时表达上调或下调的蛋白,以及在各组特异表达的蛋白,结果如图 1 所示。

2.2 生物信息学分析

2.2.1 GO 功能分类 将肝郁组和非肝郁组中共同表达的 130 个差异表达蛋白进行 GO 功能分类,

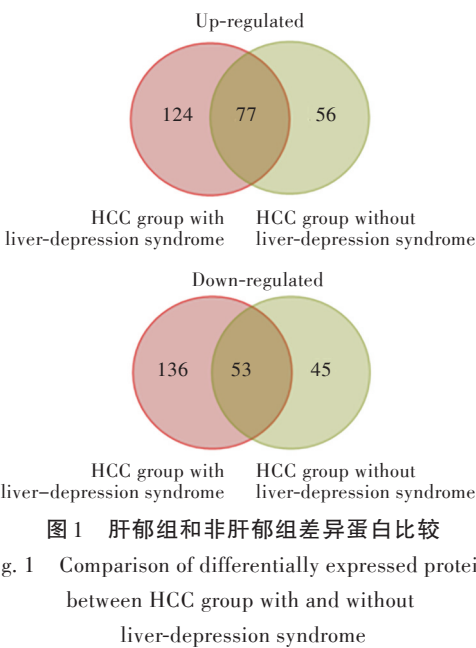


图 1 肝郁组和非肝郁组差异蛋白比较
Fig. 1 Comparison of differentially expressed proteins between HCC group with and without liver-depression syndrome

结果如图 2 所示。在生物学进程方面,差异蛋白主要参与补体激活、视网膜稳态、B 细胞激活正调控、免疫反应、吞噬作用等生物学过程。在细胞组分方面,这些蛋白主要位于胞外区等。在分子功能方面,这些差异蛋白主要涉及抗原/受体结合、抗氧化剂活性、酶活性等方面。

将肝郁组中特异表达的 260 个差异表达蛋白进行 GO 功能分类,结果如图 3 所示。在生物学进程方面,这些差异蛋白主要参与补体激活、多个信号转导通路、蛋白质水解、免疫反应等。在细胞组分方面,这些蛋白主要位于胞外区等。在分子功能方面,这些差异蛋白主要涉及抗原/受体结合、内切酶活性、蛋白酶结合等。

2.2.2 KEGG 代谢通路富集分析 KEGG 代谢通路富集分析结果显示,肝郁组和非肝郁组共同表达的差异蛋白主要富集在 5 条代谢通路(*p*<0.05),见图 4(a)。同时,对肝郁组中特异表达的差异蛋白进行 KEGG 分析发现,这些差异蛋白主要富集在 7 条代谢通路(*p* 值<0.05),见图 4(b)。

2.2.3 STRING 蛋白互作网络图谱构建 进一步应用 STRING 蛋白互作网络数据库,对肝郁证肝癌特异表达蛋白之间的相互作用进行预测,并绘制了蛋白相互作用网络图(图 5)。肝郁证肝癌蛋白相互作用网络中存在 2 个主要的蛋白功能模块,分别与蛋白酶体通路和补体途径有关。

2.3 蛋白质组学研究与传统肝癌中医辨证分型

原发性肝癌是我国常见的恶性肿瘤之一,西医结合中医辨证分型是我国肝癌治疗的一大特点。近年来,随着蛋白质组学检测技术的快速发

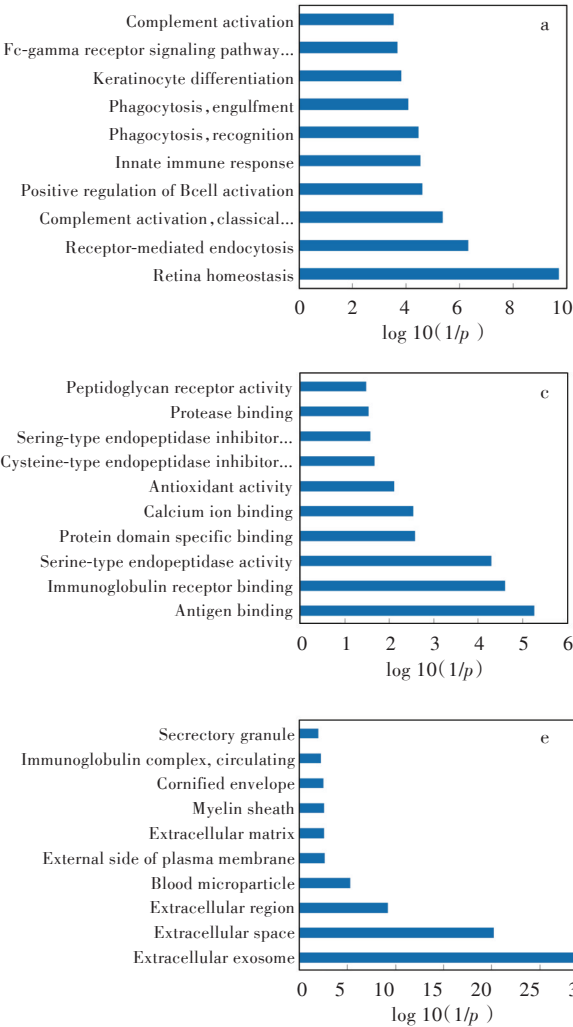


图2 肝郁组和非肝郁组中共同表达的差异蛋白GO功能分类:(a)生物学过程,(b)分子功能,(c)细胞组分

Fig. 2 GO functional classification of differentially expressed proteins that were identified in both HCC groups:

(a)biological process, (b)molecular function, (c)cellular component

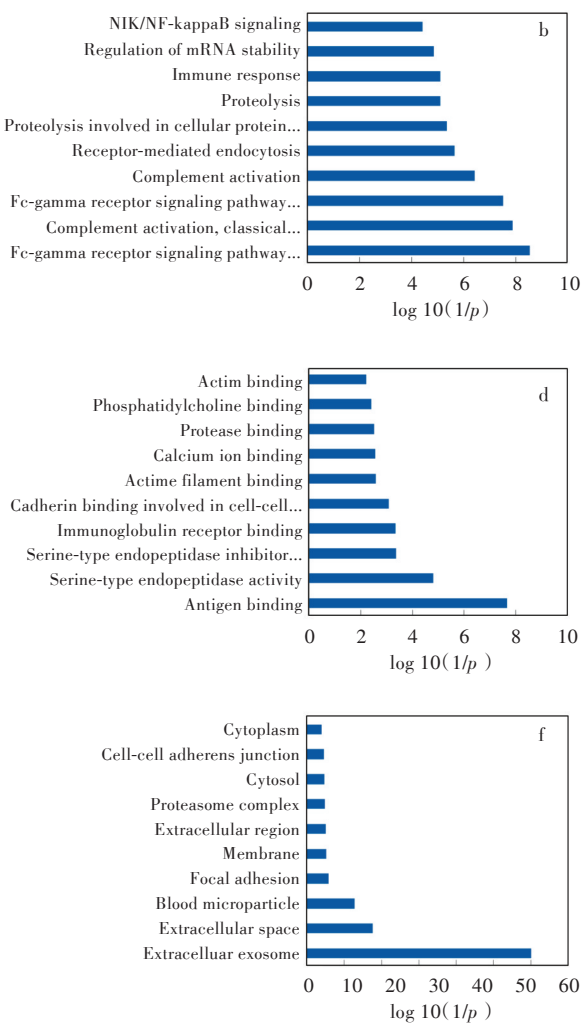


图3 只在肝癌肝郁组中特异表达的差异蛋白GO功能分类:(a)生物学过程,(b)分子功能,(c)细胞组分

Fig. 3 GO functional classification of differentially expressed proteins that were only identified in HCC group with liver-depression syndrome: (a)biological process, (b) molecular function, (c)cellular component

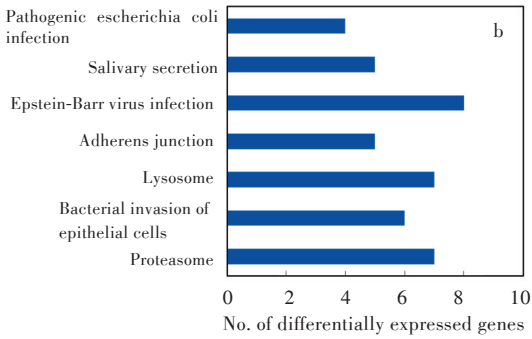
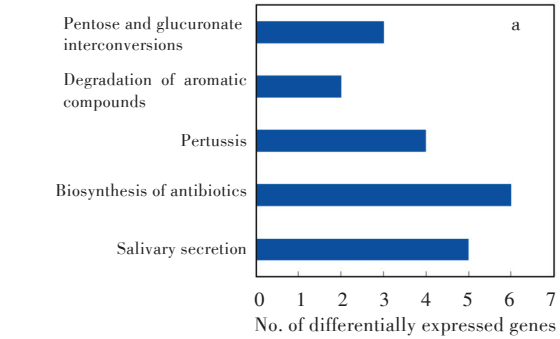


图4 (a)肝郁组和非肝郁组中共同表达的差异蛋白富集的代谢通路,(b)肝郁组中特异表达的差异蛋白富集的代谢通路

Fig. 4 (a)KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed proteins that were identified in both HCC groups, (b) KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed proteins that were specifically identified in HCC groups with liver-depression syndrome

展,将蛋白质组学研究与传统肝癌中医辨证分型相结合,给传统证候研究带来了新的契机,有利于推动中医药的临床研究^[16]。目前已有研究报道利

用表面增强激光解析电离飞行时间质谱(surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, SELDI-TOF-MS)技术,检测并发

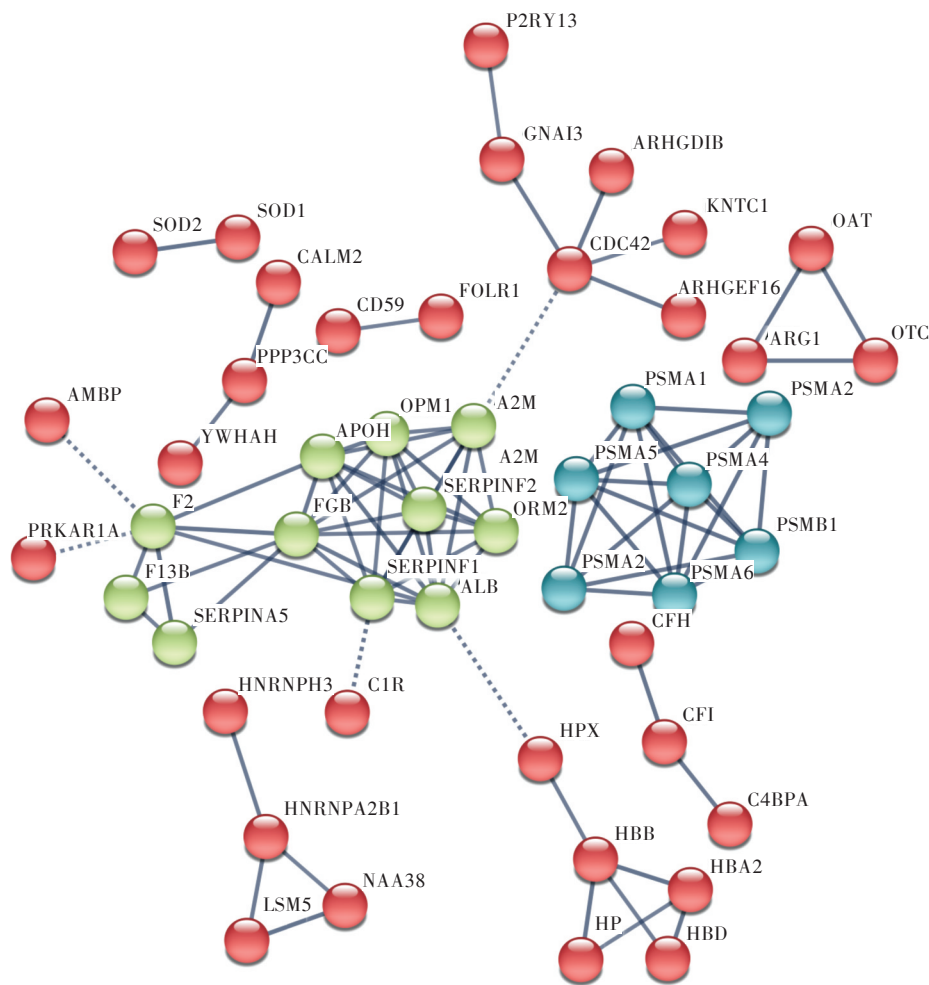


图5 STRING 蛋白相互作用网络
Fig. 5 STRING protein-protein interaction network

现不同中医证型原发性肝癌患者的血清蛋白质谱具有差异性^[17-18]。

原发性肝癌中医证候错综复杂,肝气郁结证为其中的一种常见证型^[2]。肝郁证即肝气郁结证,临床表现为因情志不舒、气机郁滞导致心情抑郁、情绪不宁、胸肋闷胀、易怒善哭等症状^[19]。肝郁证的现代病证研究表明,肝郁证涉及神经系统、血液循环系统、内分泌系统和免疫系统等多系统、多器官的病理改变^[20]。因此,肝郁证可涉及多种疾病,危害甚大,是中医病症研究的重点研究对象。本研究中,应用 iTRAQ 定量蛋白质组学技术筛选肝郁证肝癌和非肝郁证肝癌病人唾液样本的差异蛋白,发现肝郁证肝癌患者的唾液蛋白表达谱存在明显差异。

2.4 肝郁证肝癌特异表达蛋白谱及代谢通路

对肝癌肝郁证和非肝郁证的差异蛋白表达谱进行分析,在肝郁证中一共鉴定到 260 个具有显著差异表达的蛋白,包括 124 个上调蛋白和 136 个下调蛋白。KEGG 代谢通路富集分析显示,这些差异

蛋白主要富集在泛素蛋白酶体通路、自噬溶酶体通路、黏附连接通路等。

2.4.1 自噬溶酶体通路 蛋白质合成和降解的平衡是细胞生存的一个重要条件,这种平衡的破坏会导致细胞癌变或死亡。真核细胞中存在两条主要的蛋白质降解途径:蛋白酶体通路和自噬溶酶体通路。在肿瘤的发生发展中,广泛存在蛋白酶体通路和自噬溶酶体通路的变异,且两者之间可能存在互补代偿关系^[21]。自噬溶酶体通路负责降解受损或多余的蛋白质、器官、脂类等,从而维持体内代谢平衡^[22]。自噬溶酶体通路作为细胞的一种自我保护机制,在维持细胞自我稳态和促进细胞生存方面具有重要作用,若自噬未能清除冗余的蛋白质和受损的器官,则会导致 DNA 损伤的累积,从而导致肿瘤的发生发展^[23-24]。自噬的这种特点表明其在癌症的发生发展中起着双刃剑的作用,具有促进或抑制肿瘤发展的双重作用。本研究发现,参与自噬溶酶体通路的基因,除了鞘脂激活蛋白原(Prosaposin, PSAP)表达上调外,其他基

因的表达量在肝郁证中均表现为下调(图 6),包括蜡样脂褐质神经元蛋白 5(ceroid-lipofuscinosis neuronal protein 5,CLN5), α -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶(α -N-acetylglucosaminidase, NAGLU)、醌还原酶(quinone reductase, CRYZ)、半胱氨酸蛋白酶 1 (Cysteine protease 1,LGMN)、半乳糖苷酶 α (Galactosidase Alpha, GLA)和甘露糖苷酶 β (Mannosidase Beta,MANBA)。这些蛋白的表达下调可能意味着自噬能力的降低。在肿瘤发生的早期,自噬能力降低使得细胞增殖旺盛,同时 DNA 受损增加基因组的不稳定性,进而导致肿瘤的发生^[25]。因此,这些基因在肝郁证肝癌中的下调表达,提示它们可能与早期肝郁证肝癌的发生发展密切相关。

2.4.2 泛素蛋白酶体通路 泛素蛋白酶体通路是细胞内蛋白质选择性降解的重要途径,在人体许多生理活动中起着非常重要的作用,包括转录因子调控、抗原提呈、细胞凋亡调控、细胞周期调控和肿瘤发生调控等^[26]。其特殊的蛋白酶体裂解活性上调或下调某些抑癌基因、转录因子或细胞周期素的表达,从而影响癌症的发生发展^[27]。我们的研究发现,肝郁证肝癌特异表达的基因中,参

与泛素蛋白酶体通路的基因多数表达量上调(图 7),包括 PSMB1 (Proteasome Subunit Beta 1)、PSMD2 (Proteasome 26S Subunit, Non-ATPase 2)、PSMD6 (Proteasome 26S Subunit, Non-ATPase 6)、PSME1 (Proteasome Activator Subunit 1)和 PSMD1 (Proteasome 26S Subunit, Non-ATPase 1)。PSMB1 是组成 20S 蛋白酶体的亚基之一,介导泛素依赖的蛋白降解,如 MHC-I 类抗原的加工提呈等^[28]。PSMD2、PSMD1 和 PSMD6 是组成 19S 蛋白酶体的三个亚基。PSMD2 在肺癌中表达量上调,且 PSMD2 高表达与预后差相关^[29]。PSMD1 在乳腺癌中表达量同样上调,经研究发现 PSMD1 失活能够抑制乳腺癌中抑癌基因 p53 蛋白降解,从而造成 p53 蛋白累积^[30]。蛋白酶体激活因子 PSME1 为 11S 调节因子(PA28) α 亚基的编码基因,口腔鳞状细胞癌中该基因表达量上调,且与易复发和预后差相关^[31]。这些蛋白酶体亚基在多种恶性肿瘤中表达上调提示它们可能与癌症的发生发展相关。同时,STRING 蛋白相互作用网络显示,肝郁证肝癌蛋白相互作用网络中存在 2 个主要的蛋白功能模块,泛素蛋白酶体通路上的 PSMB1 蛋白正是其

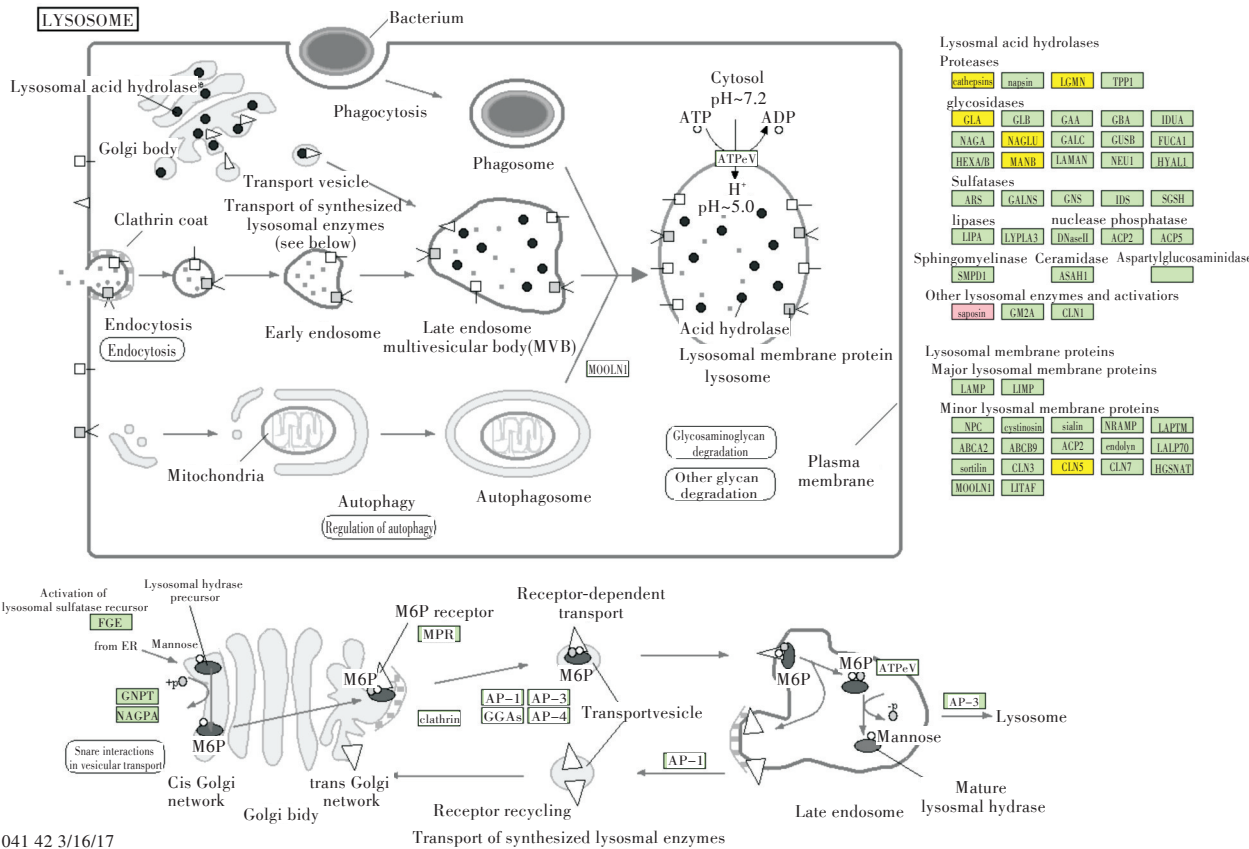
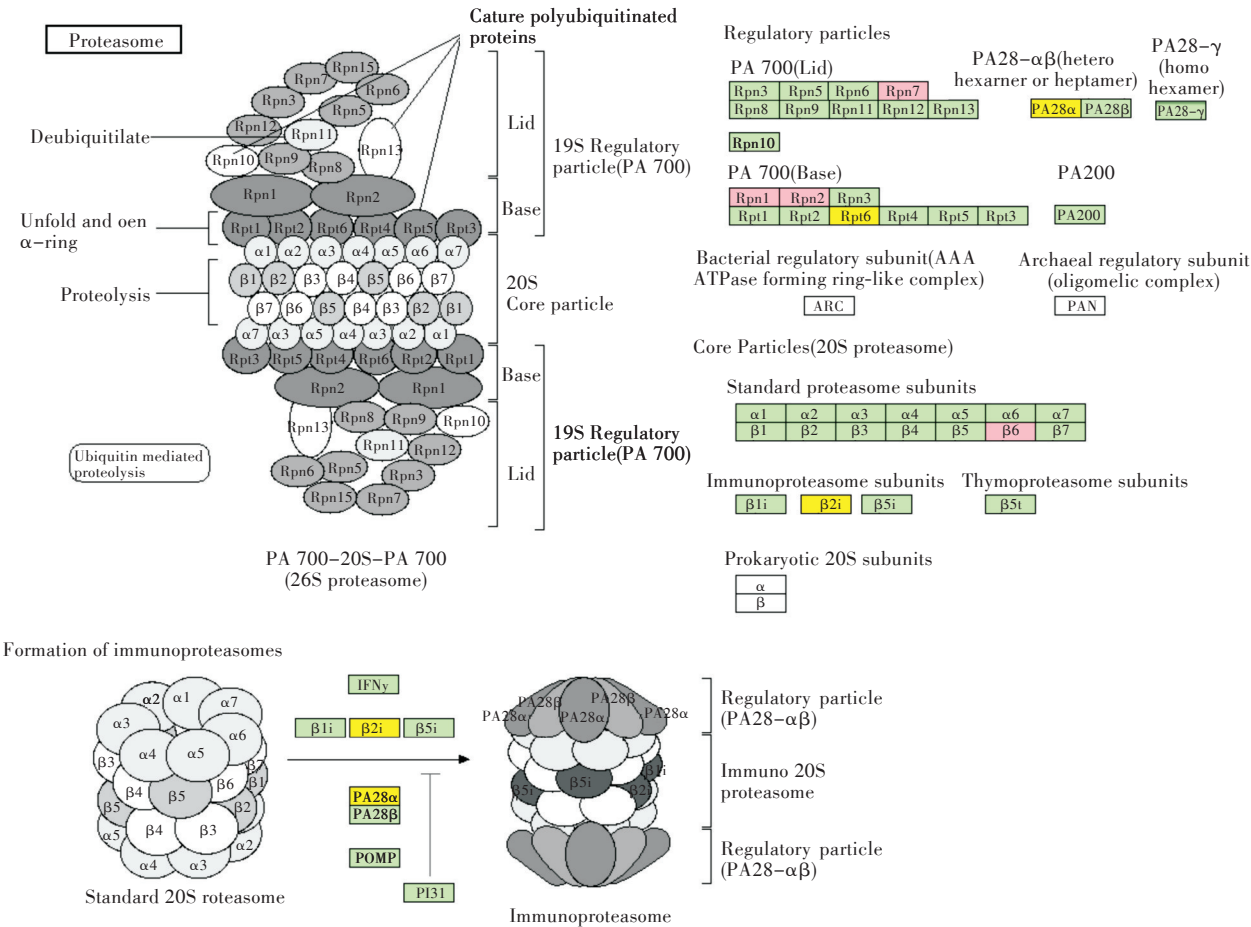


图 6 自噬溶酶体通路:粉色代表肝癌肝郁组中上调表达基因,黄色代表肝癌肝郁组中下调表达基因

Fig. 6 Lysosome pathway: pink represents up-regulated proteins in HCC group with liver-depression syndrome, yellow represents down-regulated proteins in HCC group with liver-depression syndrome



03050 5/14/14
(c)Kanehisa Laboratories

图7 泛素蛋白酶体通路:粉色代表肝癌肝郁组中上调表达基因,黄色代表肝癌肝郁组中下调表达基因

Fig. 7 Proteasome pathway: pink represents up-regulated proteins in HCC group with liver-depression syndrome, yellow represents down-regulated proteins in HCC group with liver-depression syndrome

中一个功能模块上的核心蛋白。这表明 PSMB1 有可能成为肝郁证肝癌早期诊断的一个潜在标志物,值得开展进一步研究。

3 结 语

采用 iTRAQ 定量蛋白组学技术,从分子水平探讨肝癌不同中医证型间的差异,筛选出肝郁证肝癌与非肝郁证肝癌病人的唾液差异蛋白表达谱,建立了肝郁证肝癌特异的蛋白数据库,并构建了蛋白相互作用网络,将肝郁证肝癌蛋白谱进行了可视化展示。本研究结果显示在肝癌肝郁证中表达异常的蛋白主要与蛋白质降解有关,同时系统评估了位于泛素蛋白酶体通路的蛋白酶体亚基在肝癌中的表达量变化,筛选了一个潜在的肝癌早期诊断标志物蛋白 PSMB1,为肝癌防治和中医辨证论治提供了依据。本项目不同中医证型的病例数量相对较少,具有一定的局限性,进一步研究应扩大病例个数,并进行功能实验验证差异蛋白

的可靠性,进一步揭示其证候本质和生物学机制。

参考文献

[1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36cancers in 185 countries[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2018, 68(6):394-424.

[2] 武嫣斐,王素萍,孙健民,等.原发性肝癌中医证型临床分布及证型标准[J].山西中医学院学报,2007,8(2):20-23.

[3] ROI A, RUSU L C, ROI C I, et al. A new approach for the diagnosis of systemic and oral diseases based on salivary biomolecules [J]. Disease Markers, 2019, 4: 1-11.

[4] CASTAGNOLA M, SCARANO E, PASSALI GC, et al. Salivary biomarkers and proteomics: future diagnostic and clinical utilities [J]. Acta Otorhinolaryngologica Italica, 2017, 37(2):94-101.

[5] LORENZO-POUSO A I, PEREZ-SAYANS M, BRAVO

- S B, et al. Protein-based salivary profiles as novel biomarkers for oral diseases [J]. *Disease Markers*, 2018, 2:1-22.
- [6] MISHRA S, SAADAT D, KWON O, et al. Recent advances in salivary cancer diagnostics enabled by biosensors and bioelectronics [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2016, 81:181-197.
- [7] STUANI V T, RUBIRA C M, SANT'ANA A C, et al. Salivary biomarkers as tools for oral squamous cell carcinoma diagnosis: A systematic review [J]. *Head & Neck*, 2017, 39(4):797-811.
- [8] WANG X, KACZOR-URBANOWICZ K E, WONG D T. Salivary biomarkers in cancer detection [J]. *Medical Oncology*, 2017, 34(1):7-19.
- [9] PORTO-MASCARENHAS E C, ASSAD D X, CHARDIN H, et al. Salivary biomarkers in the diagnosis of breast cancer: A review [J]. *Critical Reviews in Oncology*, 2017, 110:62-73.
- [10] CHAUHAN R, LAHIRI N. Tissue and serum-associated biomarkers of hepatocellular carcinoma [J]. *Biomarkers in Cancer*, 2016, 8(Suppl 1):37-55.
- [11] REICHL P, MIKULITS W. Accuracy of novel diagnostic biomarkers for hepatocellular carcinoma: An update for clinicians (Review) [J]. *Oncology Reports*, 2016, 36(2):613-625.
- [12] UMEDAS, KANDAM, KODERA Y. Emerging evidence of molecular biomarkers in hepatocellular carcinoma [J]. *Histology and Histopathology*, 2017, 33(4):343-355.
- [13] 杨秉辉, 夏景林. 中国抗癌协会肝癌专业委员会关于修订“原发性肝癌的临床诊断与分期标准”的说明 [J]. *实用癌症杂志*, 2001, 16(6):672.
- [14] 陈家旭, 陈青红, 徐洪雁, 等. 肝郁证候宏观辨证标准的文献计量学研究 [J]. *北京中医药大学学报*, 2004, 27(4):1-4.
- [15] HUANG D W, SHERMAN B T, LEMPICKI R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources [J]. *Nature Protocols*, 2008, 4(1):44-57.
- [16] 胡艳, 陈锐深, 王昌俊. 运用蛋白质组学研究原发性肝癌中医证型的探讨 [J]. *时珍国医国药*, 2009, 20(6):1547-1548.
- [17] 杨素芳, 邱颂平, 刘清华. 不同中医证型原发性肝癌患者介入治疗前后血清蛋白指纹图谱的观察 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2013, 33(10):1352-1355.
- [18] 黄争荣, 张小卿, 叶韵斌, 等. 蛋白指纹图谱在原发性肝癌中医辨证分型应用的初步研究 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2012, 21(33):3660-3661.
- [19] 杨文明, 陈彪, 鲍远程, 等. 肝郁证实验研究概览 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2004, 11(12):1125-1127.
- [20] 钟小兰. 肝郁证模型大鼠蛋白质组差异表达研究 [D]. 广州:南方医科大学, 2006.
- [21] 熊秋宏, 李文静, 吴长新. 自噬和泛素-蛋白酶体系统之间的交联 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2018, 34(11):24-29.
- [22] YIN Z, PASCUAL C, KLIONSKY D. Autophagy: machinery and regulation [J]. *Microbial Cell*, 2016, 3(12):588-596.
- [23] 孙雨晴, 韩锋锋. 自噬相关分子机制在肺癌中的作用 [J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2018, 17(3):319-322.
- [24] 许莲, 唐芬, 李玄, 等. mTOR 信号通路 with 自噬在肿瘤中的研究进展 [J]. *现代生物医学进展*, 2016, 16(7):1372-1374.
- [25] 崔丹蕊, 刘波, 刘伟. 细胞自噬与肿瘤发生关系的研究进展 [J]. *中国科学:生命科学*, 2015(6):593-603.
- [26] CIECHANOVER A, ORIAN A, SCHWARTZ A L. Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction [J]. *Bioessays*, 2015, 22(5):442-451.
- [27] GALLO L H, KO J, DONOGHUE D J. The importance of regulatory ubiquitination in cancer and metastasis [J]. *Cell Cycle*, 2017, 16(7):634-648.
- [28] 谭银玲, 汪仕良. 泛素-20S/26S 蛋白酶复合体在肿瘤中的作用 [J]. *医学综述*, 2000(7):322-324.
- [29] MATSUYAMA Y, SUZUKI M, ARIMA C, et al. Proteasomal non-catalytic subunit PSMD2 as a potential therapeutic target in association with various clinicopathologic features in lung adenocarcinomas [J]. *MolCarcinog*, 2011, 50(4):301-309.
- [30] OKUMURA T, IKEDA K, UJIHIRA T, et al. Proteasome 26S subunit PSMD1 regulates breast cancer cell growth through p53 protein degradation [J]. *Journal of Biochemistry*, 2018, 163(1):19-29.
- [31] FENG X, JIANG Y, XIE L, et al. Overexpression of proteasomal activator PA28 α serves as a prognostic factor in oral squamous cell carcinoma [J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2016, 35(1):35-47.

本文编辑:张 瑞