

激光捕获显微切割技术纯化的人支气管上皮癌变各阶段组织的定量蛋白质组学研究*

曾谷清¹⁾ 程爱兰³⁾ 易红²⁾ 李茂玉²⁾ 李国庆¹⁾ 李建玲^{2)**} 廖力^{1)**}

¹⁾ 南华大学护理学院, 衡阳 421001; ²⁾ 中南大学湘雅医院卫生部肿瘤蛋白质组学重点实验室, 长沙 410008;

³⁾ 南华大学医学院病理教研室, 衡阳 421001)

摘要 为分析支气管上皮癌变进程中的差异表达蛋白质, 筛选肺鳞癌早期诊断标志物, 以人支气管上皮癌变各阶段组织为研究对象, 先采用激光捕获显微切割技术(LCM) 纯化人正常支气管上皮组织、鳞状化生、不典型增生、原位癌、浸润性肺鳞癌组织, 再用同位素标记相对和绝对定量(iTRAQ) 技术结合二维液相色谱串联质谱(2D LC-MS/MS) 鉴定支气管上皮癌变进程中各阶段的差异表达蛋白质。结果共鉴定了 1 036 个蛋白质, 筛选出 102 个与人支气管上皮癌变相关的差异蛋白质, 在这些差异蛋白质中, 有的在支气管上皮癌变过程中进行性上调, 有的在支气管上皮癌变过程中进行性下调, 有的呈阶段特异性改变。功能分析表明, 这些差异蛋白质涉及代谢、细胞凋亡、增殖、分化、信号传导、转录、翻译、细胞黏附、免疫反应与发育等。Western blotting 及免疫组织化学技术验证了其中 2 个差异蛋白(S100A9 和 CKB) 的表达, 证实了定量蛋白质组学结果的可靠性。研究结果提示: 这些差异表达蛋白质与支气管上皮癌变相关, 并可成为肺鳞癌的早期诊断标志物, 进一步研究差异蛋白质的生物学功能, 将有助于阐明支气管上皮的癌变机制, 从而为肺鳞癌的早期诊断与发病机制研究提供新思路。

关键词 人支气管上皮癌变, 肺鳞癌, 生物标志物, 激光捕获显微切割技术, 同位素标记相对和绝对定量

学科分类号 R310.99, R57

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00474

肺癌是常见的恶性肿瘤之一, 根据世界卫生组织统计, 肺癌的发病率和死亡率均居全球恶性肿瘤的首位。在我国, 肺癌是发病率最高的恶性肿瘤之一, 且其发病率和死亡率逐年上升。肺鳞癌作为肺癌最主要的组织学类型, 它起源于支气管上皮且其发生发展是一个多因素、多基因参与、多阶段的复杂病变过程。在致癌因素作用下, 支气管上皮细胞的癌变过程一般要经过基底细胞增生、鳞状化生, 进而进展为不典型增生、原位癌, 再发展为浸润癌。然而, 其发病机制迄今尚不明确, 且肺鳞癌起病隐匿, 早期一般没有明显症状, 70% 的肺鳞癌临床发现时已是晚期, 失去了临床早期治疗的宝贵机会, 5 年生存率仅为 8.9%~15%, 而 I 期肺鳞癌术后 5 年生存率高达 80%。因此, 阐明肺鳞癌的发病机制与寻找早期诊断标志物对于提高疗效和改善预后起关键作用。

寻找癌症标志物、探明癌症发病机制一直是全

球科学家为之努力的事情。虽然 Sekido, Tseng, Bai 等从基因水平和转录水平已对肺鳞癌进行了许多成功的研究, 但其癌变机制仍不清楚, 目前也缺乏有效的用于早期诊断肺鳞癌的分子标志物^[1-3]。

蛋白质是生命活动的执行者, 在肺鳞癌癌变过程中, 不论是环境因素还是遗传因素最终都是通过基因及其相应的蛋白质来发挥作用。肺鳞癌在其不同的发展阶段, 即使在没有任何症状的早期, 在蛋白质水平已经发生了变化, 而这些在早期发生变化

* 国家自然科学基金(81272959, 81072198)和湖南省自然科学基金(12JJ6080)资助项目。

** 通讯联系人。

李建玲. Tel: 0731-84327334, Fax: 0731-84327332,

E-mail: jianlingli@yahoo.com

廖力. Tel: 0734-8281809, Fax: 0734-8281344,

E-mail: liaoli201@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-09-26, 接受日期: 2012-12-26

的蛋白质有可能成为临床早期诊断的指标。因此, 寻找肺鳞癌癌变过程中起关键作用的蛋白质分子对于肺鳞癌的早期诊断起重要作用。

蛋白质组学(Proteomics)在发现肿瘤分子标志物和治疗靶标等方面具有独特的优势。国内外学者对肺鳞癌进行了大量的蛋白质组学研究, Zhang 等^[4]建立了人肺鳞癌细胞系 NCI-H226 的蛋白质图谱; Dowling 等^[5]以血清为样品运用蛋白质组学技术鉴定了肺癌的血清学生物标志物, 以期进行早期肺癌检测; Wu 等^[6]采用 DOC-TCA 沉淀法纯化蛋白质建立了人支气管上皮癌变各阶段组织 2-DE 图谱并进行了差异分析; Li 等^[7]进行了肺鳞癌原发灶和淋巴结转移灶的差异蛋白质组研究。以上研究大多采用传统的双向凝胶电泳(2-DE)技术, 有的以细胞株为研究对象, 但细胞株不能完全反映肺鳞癌的真实情况; 有的尽管采用组织为研究对象, 但由于支气管上皮中仅含少量的目的细胞, 而组织并未纯化, 因而没有解决组织的异质性问题。

激光捕获显微切割技术(laser capture microdissection, LCM)可以选择性地捕获目的细胞群, 获取特定的组织细胞, 用于 DNA、RNA 和蛋白质分析, 保证了样品的纯度和精确度^[8], 是纯化组织中目的细胞的有效方法, 解决了组织样品的异质性问题。

由美国应用生物系统公司(ABI)开发的同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantitation, iTRAQ)技术是一种新的、功能强大的、可同时对 4 种样品进行相对和绝对定量研究的方法。具有很好的精确性和重复性, 可弥补 DIGE 及 ICAT 的不足, 被广大科研人员所接受。Wu 等^[9]对 iTRAQ-MS/MS、ICAT-MS/MS、2D-DIGE 等方法在蛋白质组研究中的效果进行了评估, 证明 iTRAQ-MS/MS 是最为灵敏的方法。

iTRAQ 标记结合 2D LC-MS/MS 技术不仅是寻找肿瘤标志物的有效方法, 而且能同时对多种不同样本中的蛋白质进行定量比较, 因而可以同时研究支气管上皮癌变过程中各个不同阶段蛋白质表达质和量的变化, 能真实地反映支气管上皮癌变过程中蛋白质的变化情况。因此, 本研究以 LCM 纯化的人正常支气管上皮、鳞状化生、不典型增生、原位癌及浸润性肺鳞癌组织为样本, 应用 iTRAQ 标记技术和 LC-MS/MS 技术比较支气管上皮癌变各阶段组织蛋白质表达谱的差异, 为筛选肺鳞癌早期诊断标志物与研究其发病机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织. 80 例新鲜肺组织样本(其中包括 20 例正常支气管黏膜上皮组织(NBE)、20 例鳞状化生上皮组织(SM)、20 例不典型增生上皮组织(AH)、15 例原位癌组织(CIS)、20 例肺鳞癌组织(LSCC)), 均取自中南大学湘雅二医院胸外科的肺癌手术切除标本, 其中各 10 例组织(5 例原位癌组织)分别用于 iTRAQ 2D LC-MS/MS, 另 10 例组织分别用于 Western blotting 分析。以上病人术前未接受放疗和化疗(2007~2008 年), 并经病理学专家确诊。石蜡包埋组织标本(2000~2009 年)包括 NBE、SM、AH、LSCC 组织各 45 例, CIS 组织 13 例, 取自湖南省人民医院病理科, 用于免疫组织化学染色分析。

1.1.2 试剂. iTRAQ 标记试剂, 为 Applied Biosystems 公司产品; 2D Quant Kit 蛋白质定量试剂盒、DTT、尿素、硫脲为 Amersham Biosciences 公司产品; 甲基绿组织染色剂、碳酸氢铵、三氟乙酸、胰蛋白酶为 Sigma-Aldrich 公司产品; 蛋白酶抑制剂 PMSF 为 Indianapolis 公司产品; 蛋白酶抑制剂 Cocktail Set III 为 Roche 公司产品; 乙腈为 Fisher scientific 公司产品; 甲酸为 TEDIA 公司产品; KH_2PO_4 、KCl 为国药集团产品; OCT 组织包埋剂、带 PEN 膜的载片、LCM 专用 Eppendorf 管, 为德国 Leica 公司产品; PVDF 膜为瑞典 Amersham 公司产品; ECL 试剂盒为 Amersham 公司产品; Zorbax 300SB- C_{18} 柱(0.1 mm×15 mm, 5 μm , 300 Å)为 Microm 公司产品; Polysulfoethyl 柱(2.1 mm×100 mm, 5 μm , 300 Å)为 The Nest Group 公司产品; C_{18} 脱盐柱为 Waters 公司产品; 兔抗人 S100A9 为 Abcam 公司产品; 兔抗人 CKB 和鼠抗人 β -Actin 为 Sigma-Aldrich 公司产品; 辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠和羊抗兔二抗为 Santa Cruz 公司产品; 即用型鼠/兔免疫组织化学超敏 UltraSensitive™ S-P 试剂盒、苏木素染色剂为福建迈新公司产品。

1.1.3 主要仪器与软件. 冰冻切片机、激光捕获显微切割仪(Leica AS)为 Leica 公司产品; 20AD HPLC 仪为岛津公司产品; QSTAR XL 质谱仪为 Applied Biosystem 公司产品; Imagescanner 扫描仪为 Amersham Biosciences 公司产品; 真空冷冻干燥仪为 Savant speed Vac & UVS400 公司产品; Analyst QS 1.1 和 ProteinPilot™ 3.0(revision 114732)软件为 Applied Biosystem 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 LCM 纯化癌变各阶段支气管黏膜上皮与肺鳞癌组织. 新鲜的人支气管上皮癌变各阶段组织标本从 -80°C 低温冰箱取出后, 迅速移入 -25°C 的冰冻切片中, 用 OCT 将组织包埋后, 先行 HE 染色明确组织学类型, 再行 $7\text{ }\mu\text{m}$ 厚连续切片并贴于载玻片的 PEF 膜上, 75% 乙醇固定, 0.5% 甲基绿染色, 双蒸水漂洗后室温干燥. 然后在显微镜下选择目的细胞进行激光捕获显微切割, 收集切割下来的目的细胞, 置于 -80°C 低温冰箱冻存.

1.2.2 抽提组织总蛋白并测定蛋白质浓度. 将 LCM 纯化的每例目的细胞用 70% 预冷的乙醇脱色后加入适量的蛋白质裂解液(7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 65 mmol/L DTT, 0.1 mmol/L PMSF), 充分混匀, 4°C 裂解 1 h , 冰上间隔超声以使蛋白质充分裂解, $12\text{ }000\text{ r/min}$, 4°C 离心 45 min , 取上清即为组织细胞总蛋白. 用 50 mmol/L NaOH 调节蛋白 pH 值至 $8.0\sim 9.0$ 之间. 取 $5\text{ }\mu\text{l}$ 用 2D Quant Kit 定量试剂盒测定蛋白质浓度, 其余上清置 -80°C 保存备用.

1.2.3 iTRAQ 标记. 由于支气管黏膜上皮各癌变阶段组织细胞具有局部性, 从一个组织样本中纯化收集的目的细胞太少(尤其是不典型增生与原位癌), 无法进行 iTRAQ 标记, 所以将分别来自于 10 例肺鳞癌组织或支气管黏膜上皮各癌变阶段组织纯化后的目的细胞等量混合, 用于 iTRAQ 标记. 样品解冻后, 经变性、半胱氨酸封闭、 37°C 孵育酶解过夜后, 每管样品($100\text{ }\mu\text{g}$)中加入对应的 iTRAQ 试剂(NBE: iTRAQTM reagent 117; SM: iTRAQTM reagent 114; AH/CIS: iTRAQTM reagent 116; 和 invasive LSCC: iTRAQTM reagent 115)漩涡混匀, 在室温下孵育 1 h , 每管加入 $100\text{ }\mu\text{l}$ 超纯水, 终止 iTRAQ 标记反应, 室温下孵育 30 min 后, 将被标记的所有样品混合至一管中混匀, 冻干, 样品经 C18 脱盐柱脱盐后再冻干. 实验重复 3 次.

1.2.4 离线 2D LC-MS/MS. 经 iTRAQ 标记后的样品溶解于 1 ml SCX 加样缓冲液(25% 乙腈, 10 mmol/L KH_2PO_4 , pH 2.8)后, 混匀, 将样品装入 Polysulfoethyl 柱子($2.1\text{ mm}\times 100\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$, $200\text{ }\text{\AA}$, The Nest Group, Inc.MA)中, 用 20AD HPLC 色谱分离系统分离, 紫外检测波长为 $214\text{ nm}/280\text{ nm}$, 流速为 $200\text{ }\mu\text{l/min}$, 时间为 60 min , 根据峰型和时

间共收取 30 个馏份. 真空离心浓缩后, 用 $50\text{ }\mu\text{l}$ RPLC A 相[$5\%\text{ACN}$, 0.1% 甲酸(TEDIA, Fairfield, USA)]液溶解, 进行二维分析. 将样品装入 Zorbax 300SB-C₁₈ 柱子($0.1\text{ mm}\times 15\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$, $300\text{ }\text{\AA}$, microm, USA)后, 采用 20AD HPLC 系统色谱分离[色谱分离时间为 90 min , 梯度: B%($95\%\text{ACN}$, 0.1% 甲酸)从 $5\text{ min } 5\%$ 到 70 min 上升至 35% , 流速: 200 nl/min]. 质谱分析采用信息依赖性获取模式(information dependent acquisition mode, IDA), 先在 $400\sim 1\text{ }800\text{ m/z}$ 范围进行一次全扫描, 然后选择其中离子强度最高的 4 个离子峰进行二级离子扫描. 子离子谱图在 $100\sim 2\text{ }000\text{ m/z}$ 范围内累加 2 s , Q2 设置为增加所有离子模式, 动态排除采用 $\pm 0.015\%$ (150 ppm)的允许范围, 排除时间设定为 30 s . 实验重复 3 次.

1.2.5 数据库搜索. 将 Analyst QS1.1 软件(Applied Biosystems)采集到的质谱分析数据导入基于 ParagonTM 搜索算法和 Pro GroupTM (Applied Biosystems, 版本号: 3.0.0.0, 13442)的 ProteinPilotTM 3.0 软件(Applied Biosystems 公司, 版本号: 114732), 选择 Paragon Method, 搜索 IPI 数据库(IPI human database, version: 3.45, 143958 entries)鉴定蛋白质, 同时用 m/z 114、115、116、117 报告离子的峰面积积分进行相对定量分析. 参数设定如下: Sample type, iTRAQ (peptide labeled); Cys. Alkylation, MMTS; Digestion, Trypsin; Instrument, QSTAR ESI; ID focus, Biological modification, Amino acid substitutions; Species, Homo; Search Effort, Thorough; Database, IPI human database (version: 3.45, 143958 entries); Max missed cleavages, 2; FDR Analysis, Yes; User Modified Parameter Files, No; Bias Correction, Auto; Background Correction, Yes; The precursor tolerance, 0.2 Da ; The iTRAQ fragment tolerance, 0.2 Da ; Detected Protein Threshold [Unused Protscore (Confidence)] $>1.3(95\%)$. 采用公式 $FDR=2\times n_{\text{rev}}/(n_{\text{tar}}+n_{\text{rev}})$ (n_{rev} 为与反库相匹配的蛋白数目, n_{tar} 为与正库相匹配的蛋白数目)计算错误鉴定率^[8].

1.2.6 Western blotting 分析验证部分差异蛋白质. NBE、SM、AH、CIS 和 LSCC 组织细胞各 10 例经 LCM 纯化后, 分别取 $30\text{ }\mu\text{g}$ 蛋白质加等体积的上样缓冲液热变性后再进行 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离, 电泳后将蛋白质转移至

PVDF 膜, 5%脱脂牛奶室温封闭 2 h, 兔抗人 S100A9 和兔抗人 CKB 一抗 4℃ 孵育过夜, TBST 缓冲液漂洗 10 min×3, 辣根过氧化物酶标记羊抗兔和羊抗鼠二抗室温孵育 1 h, TBST 缓冲液漂洗 10 min×3, ECL 发光, X 片曝光, 显影, 定影. β -actin 作内参照(1:3 000, Sigma 公司), 实验重复 3 次. ImageQuant 软件分析蛋白质条带的灰度值, 计算蛋白质表达的相对强度.

1.2.7 免疫组织化学染色. 免疫组织化学染色操作步骤按 S-P 免疫组化试剂盒说明书进行. 简要步骤如下: ① 石蜡切片常规脱蜡并水化; ② 抗原修复: 0.1 mol/L 枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0) 98℃ 维持 20 min 进行微波抗原修复; ③ 过氧化酶阻断溶液(试剂 A) 阻断内源性过氧化物酶的活性 10 min; ④ 非免疫动物血清(试剂 B)室温孵育 10 min; ⑤ 一抗 S100A9 (1:200, Abcam 公司)、CKB (1:250, Sigma 公司) 4℃ 孵育过夜, PBS 代替一抗作为阴性对照; ⑥ 二抗(试剂 C)室温孵育 15 min; ⑦ 链霉素抗生素 - 过氧化物酶溶液(试剂 D)室温孵育 15 min; ⑧ DAB 显色, 苏木素复染, 脱水, 透明, 中性树脂封片.

1.2.8 免疫组织化学染色评分. 采用双盲法对免疫组织化学染色进行评分. 随机选取 10 个高倍镜视野($\times 200$), 计数 1 000 个细胞, 以积分法计算结果^[8], 即根据每张切片的染色强度和阳性细胞比例计分. 着色强度: 无色 0 分; 浅黄色 1 分; 棕黄色 2 分; 棕褐色 3 分. 着色细胞比例: 无着色 0 分; < 30% 为 1 分; 30%~60% 为 2 分; $\geq 60\%$ 为 3 分. 两者相加 0~2 分为弱阳性; 3~4 分为中等阳性; 5~6 分为强阳性.

1.2.9 统计学分析. 应用 SPSS15.0 统计软件对实验结果进行统计学分析, 两两比较用 Mann whitney U test, $P < 0.05$ 被认为差异有统计学意义.

2 结 果

2.1 LCM 纯化 NBE、SM、AH、CIS 和 LSCC 组织

采用 LCM 技术分别从支气管上皮组织和肺鳞癌组织中分离纯化 NBE、SM、AH、CIS 和 LSCC 组织细胞, 以排除非目的细胞的干扰. 组织先经 HE 染色确定组织学类型, 再经甲基绿染色后用 LCM 分别纯化 NBE、SM、AH、CIS 和 LSCC 组织细胞, 根据组织细胞在切片中的位置和大小调整视野, 在直视下, 所获得的目的细胞纯度 $\geq 95\%$ (见网络版附录图 S1, http://www.pibb.ac.cn/cn/ch/common/view_abstract.aspx?file_no=20120474&flag=1).

2.2 iTRAQ 标记结合 2D LC-MS/MS 鉴定支气管上皮癌变各阶段组织的蛋白质

为减少实验误差, 我们对混合样本进行了 3 次 iTRAQ 标记和 2D LC-MS/MS 质谱鉴定, 3 次实验的结果见表 1. 第一次质谱鉴定非冗余蛋白质 633 个, 假阳性率为 0.63%, 和第二次质谱相比重复鉴定的蛋白质数为 386 个, 重复鉴定率为 61.00%; 和第三次质谱相比重复鉴定的蛋白质数为 538 个, 重复鉴定率为 84.99%. 第二次质谱鉴定非冗余蛋白质 726 个, 假阳性率为 1.38%, 和第三次质谱相比重复鉴定的蛋白质数为 642 个, 重复鉴定率为 88.43%. 第三次质谱鉴定非冗余蛋白质 863 个, 假阳性率为 1.62%, 和第一次质谱相比重复鉴定的蛋白质数为 538 个, 重复鉴定率为 62.34%, 和第二次质谱相比重复鉴定的蛋白质数为 642 个, 重复鉴定率为 74.39%. 3 次质谱总共鉴定非冗余蛋白质 1036 个, 806 个蛋白(77.8%)被 2 次质谱鉴定. 3 次质谱同时鉴定的蛋白质有 380 个, 其中 318 个蛋白质鉴定了 2 个或 2 个以上肽段, 比率为 83.7%. 结果见图 1.

Table 1 Summary of identified proteins by the three mass spectrometry

Unused (Conf) cutoff	Experiment 1					Experiment 2					Experiment 3				
	PD	PBG	DP	SI	TS	PD	PBG	DP	SI	TS	PD	PBG	DP	SI	TS
> 2.0 (99)	437	1 711	5 604	18 142	51.8	544	2 245	6 581	18 924	63.7	665	2 624	10 286	38 420	59.3
> 1.3 (95)	633	2 488	6 143	19 113	54.6	726	3 101	6 938	19 522	65.7	863	3 517	10 843	39 516	61.0
> 0.47 (66)	716	2 860	6 464	19 515	55.7	841	3 536	7 170	19 847	66.8	1 012	4 139	11 466	40 341	62.3
Cutoff applied: >1.3 (95%)*	633	2 488	6 143	19 113	54.6	726	3 101	6 938	19 522	65.7	863	3 517	10 843	39 516	61.0

*Unused protscore >1.3 (95%). PD: Proteins detected; PBG: Proteins before grouping; DP: Distinct peptides; SI: Spectra identified; TS: % Total spectra.

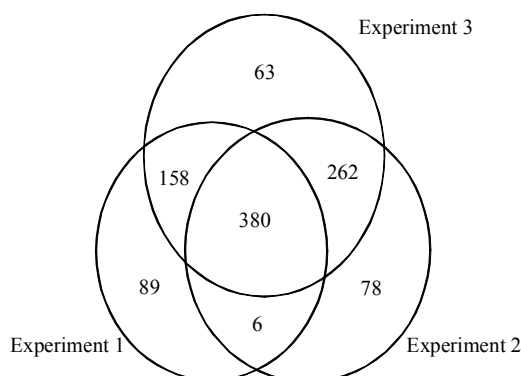


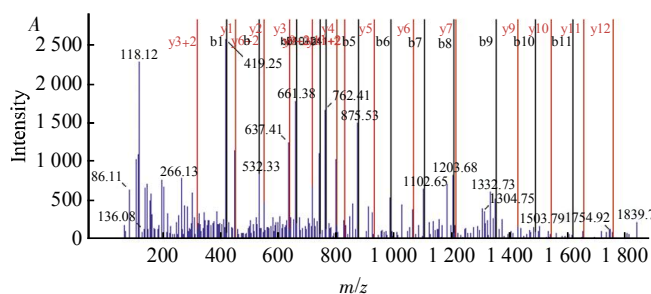
Fig. 1 Comparison of three mass spectrometry identification of proteins

2.3 筛选支气管上皮癌变各阶段组织的差异表达蛋白质

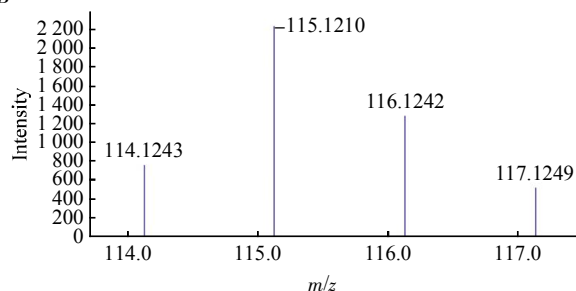
筛选的差异表达蛋白质需同时满足下列条件:

a. 在 3 次技术重复中均被鉴定; b. 蛋白质的鉴定基于两个或两个以上特异性肽段; c. 在 NBE *vs.* SM、SM *vs.* AH/CIS、AH/CIS *vs.* LSCC、NBE *vs.* LSCC 4 种不同的差异比较中至少有一种比较有差异, 且其差异在 3 次实验中的蛋白质平均变化比率 ≥ 1.5 或 ≤ 0.67 (t test, $P < 0.05$); 根据上述差异蛋白质筛选要求, 我们共筛选到 102 个差异表达蛋白质, 结果见网络版附录表 S1 (http://www.pibb.ac.cn/cn/ch/common/view_abstract.aspx?file_no=20120474&flag=1). S100A9 和 CKB 的 MS/MS 质谱图和相对定量信息见图 2.

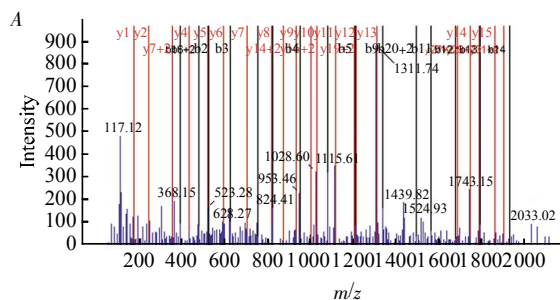
(a) S100-A9(NIETIINTFHQYSVK, $m/z=805.7879$, $z=3$)



B



(b) CKB(SMTEAEQQQLIDHFLFDKPVSPDLLASGMAR, $m/z=1048.7987$, $z=4$)



B

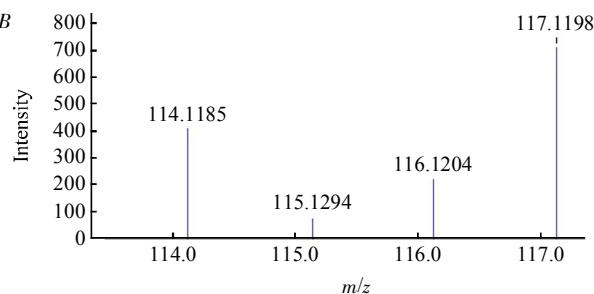


Fig. 2 MS/MS spectra used for the identification and quantitation of S100A9 and CKB

(a) A: The sequence NIETIINTFHQYSVK allows the identification of S100A9; B: The released iTRAQ reporter ions provide the relative quantitation of S100A9 from the four tissues evaluated. (b) A: The sequence SMTEAEQQQLIDHFLFDKPVSPDLLASGMAR allows the identification of CKB; B: The released iTRAQ reporter ions provide the relative quantitation of CKB from the four tissues evaluated. NBE: Labeled with iTRAQ reagent 117; SM: Labeled with iTRAQ reagent 114; AH/CIS: Labeled with iTRAQ reagent 116; and invasive LSCC: labeled with iTRAQ reagent 115.

通过在线 David Functional Annotation 工具分析 102 个差异蛋白质的亚细胞定位和生物学功能。生物学功能分析表明, 这些差异蛋白质涉及代谢、细胞凋亡、增殖、分化、信号传导、运输、转录、翻译、细胞黏附、免疫反应、细胞周期、血管发生

与发育等(图 3a)。亚细胞定位分析显示, 这些差异蛋白质主要定位于胞浆, 其次是胞核, 有的位于线粒体、质膜、内质网、核被膜, 而有的则分泌到细胞外基质(图 3b)。

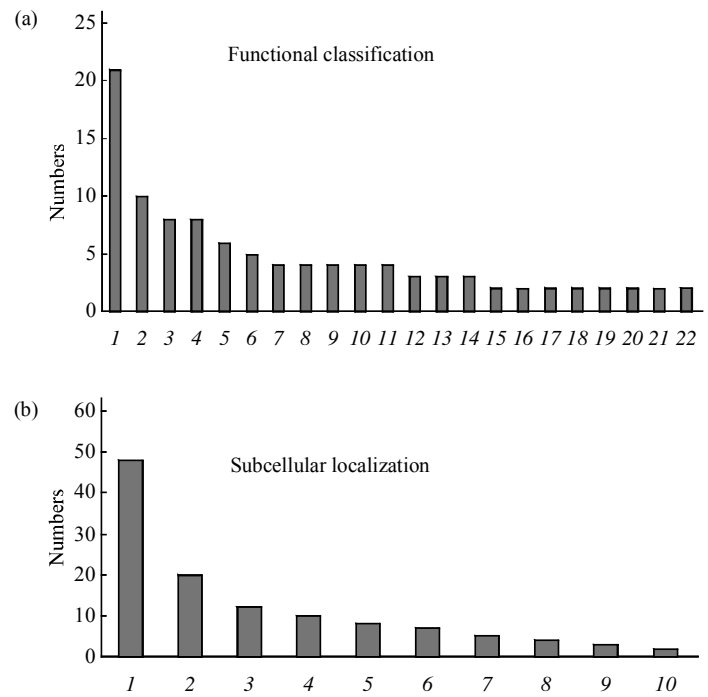


Fig. 3 Biological functions and subcellular location of the identified 102 proteins

(a) Histogram representing the distribution of the identified 102 proteins according to their biological function. 1: Metabolic process; 2: Apoptosis; 3: Structural molecule activity; 4: Translation; 5: Signal transduction; 6: Cell proliferation; 7: Cell differentiation; 8: Transport; 9: Cell adhesion; 10: Transcription; 11: Other; 12: Immune response; 13: Development; 14: Chaperone; 15: Cell cycle; 16: DNA binding; 17: Calcium ion binding; 18: ATP binding; 19: GTP binding; 20: Angiogenesis; 21: Defense response; 22: Cell movement and migration. (b) Histogram representing the distribution of the identified 102 proteins according to their subcellular locations. 1: Cytoplasm; 2: Nucleus; 3: Other; 4: Mitochondrion; 5: Plasma membrane; 6: Endoplasmic reticulum; 7: Secreted; 8: Extracellular matrix; 9: Melanosome; 10: Nucleus envelope.

2.4 Western blotting 验证 S100A9 和 CKB 的表达水平

为验证蛋白质组学的研究结果, 采用 Western

blotting 方法检测差异表达蛋白 S100A9 和 CKB 在 10 例 LCM 纯化的 NBE、SM、AH、CIS 和 LSCC 组织中的表达水平. 结果如图 4a 所示: S100A9 在

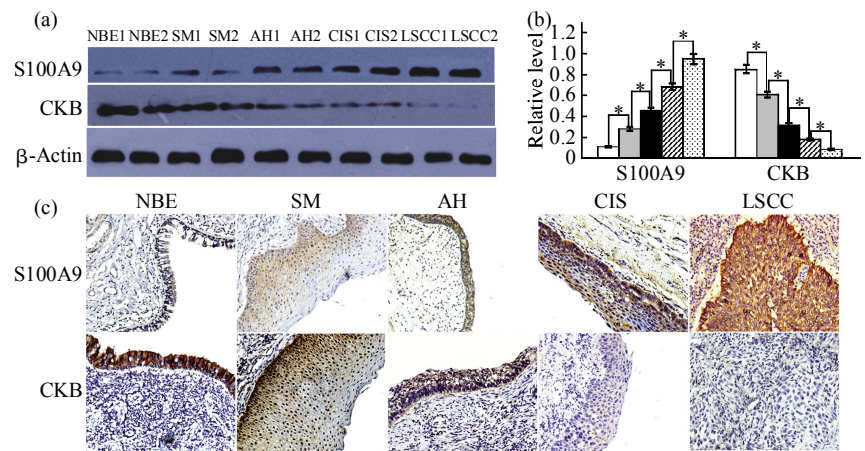


Fig. 4 Expressional changes of S100A9 and CKB in the human bronchial epithelial carcinogenic process

(a) A representative result of Western blotting shows the expressions of S100A9 and CKB in the microdissected NBE, SM, AH, CIS and invasive LSCC. (b) Histogram shows the expression levels of the two proteins in these tissues as determined by densitometric analysis. β-Actin is used as the internal loading control. Columns, mean from 10 cases of tissues; bars, SD (* $P < 0.05$ by One-way ANOVA). □: NBE; ▤: SM; ■: AH; ▨: CIS; ▩: LSCC. (c) A representative result of immunohistochemistry shows the expression of S100A9 and CKB in the NBE, SM, AH, CIS and invasive LSCC. Original magnification, $\times 200$.

支气管上皮癌变过程中, 其表达水平进行性上调($P < 0.05$), 而 CKB 的表达水平在支气管上皮癌变过程中进行性下调($P < 0.05$). Western blotting 检测结果与 2D LC-MS/MS 研究结果一致.

2.5 免疫组织化学染色进一步验证 S100A9 和 CKB 的表达水平

为进一步验证比较蛋白质组学的研究结果, 采用免疫组织化学染色方法检测 S100A9 和 CKB 分别在 45 例福尔马林固定、石蜡包埋的 NBE、SM、

AH、LSCC 组织及 13 例 CIS 组织中的表达. CIS 组织只有 13 例, 因此 AH 与 CIS 合并到一起进行统计分析. 免疫组化染色的结果见表 2 和图 4c. 应用 SPSS15.0 版统计软件对实验结果进行统计学分析, 结果显示: S100A9 在支气管上皮癌变过程中进行性上调(表 2, $P < 0.05$); 而 CKB 的表达水平在支气管上皮癌变过程中进行性下调(表 2, $P < 0.05$), 免疫组织化学染色结果与比较蛋白质组学分析结果一致.

Table 2 The difference of S100A9 and CKB expression in bronchial epithelial carcinogenic process

	<i>n</i>	Score			<i>P</i>
		Low(0~2)	Moderate(3~4)	High(5~6)	
S100A9					
NBE	45	24	16	5	0.010*
SM	45	12	23	10	0.011*
AH/CIS	58	6	28	24	0.016*
LSCC	45	3	12	30	0.000*
CKB					
NBE	45	6	15	24	0.025*
SM	45	12	19	14	0.043*
AH/CIS	58	23	27	8	0.004*
LSCC	45	31	11	3	0.000*

* $P < 0.05$ by Mann-Whitney U test.

3 讨 论

肺癌是我国发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一, 且其发病率和死亡率逐年上升. 由于缺乏有效的早期诊断标志物, 70%的肺癌被临床发现时, 已到了晚期阶段, 失去了早期治疗的宝贵机会, 5 年生存率不超过 15%. 肺鳞癌是肺癌最主要的组织学类型. 因此, 寻找肺鳞癌的早期诊断标志物对提高肺癌的疗效和改善其预后起关键作用.

肺鳞癌起源于支气管上皮, 且其发生、发展是一个多阶段过程. 鉴定在人支气管上皮细胞癌变过程中表达发生改变的蛋白质是寻找肺鳞癌早期诊断标志物的重要手段之一. 本研究采用 iTRAQ 标记技术结合 2D LC-MS/MS 分析比较 LCM 纯化的 NBE、SM、AH/CIS 和 LSCC 组织差异表达的蛋白质. 结果共鉴定了 102 个与支气管上皮癌变相关的差异蛋白质, 在这些差异蛋白质中, 有的在支气管上皮癌变的过程中进行性上调, 有的在支气管上皮

癌变的过程中进行性下调, 有的呈阶段特异性改变. 为了证实质谱结果的可靠性, 我们采用 Western blotting 和免疫组织化学染色技术对在支气管上皮细胞癌变过程中呈进行性改变的 2 个差异蛋白质(S100A9 和 CKB)进行了验证. 结果显示: S100A9 的表达在 NBE、SM、AH/CIS 和 LSCC 组织中进行性上调; 而 CKB 的表达水平在 NBE、SM、AH/CIS 和 LSCC 组织中进行性下调($P < 0.05$). Western blotting 和免疫组织化学染色检测结果不仅验证了蛋白质组学研究结果的正确性, 同时也表明, S100A9 和 CKB 蛋白的表达水平与支气管上皮癌变阶段相关, 这 2 个蛋白质参与了支气管上皮的癌变过程.

这些差异蛋白质以胞浆蛋白为主, 其次为核蛋白、质膜蛋白、分泌蛋白、线粒体蛋白和内质网蛋白等. 其生物学功能分析表明这些差异蛋白质是通过调节细胞代谢、细胞凋亡、增殖、分化、信号传导、运输、转录、翻译、细胞黏附、免疫反应、细

胞周期、血管发生等方式参与支气管上皮癌变。

在鉴定的差异蛋白质中, S100A9 的表达水平在支气管上皮癌变的进程中进行性上调, Western blotting 和免疫组织化学染色证实了蛋白质组学的研究结果。S100A9(又称 calgranulin B、MRP14)属于 S100 家族成员之一, 常与 S100A8 以钙离子依赖性方式形成异二聚体, 参与钙离子的信号传导, 在细胞生长、运动及细胞分化过程起着极其重要的作用, 被认为是与肿瘤发生发展紧密相关的因子^[10]。文献报道 S100A9 的表达强度随宫颈上皮内瘤变的级别升高而增强^[11]。S100A8/A9 可以激活肿瘤进展中关键基因和信号通路, 促进结肠癌的生长和转移^[12]。朱雪洁等^[13]发现, S100A9 在正常宫颈组织、宫颈上皮内瘤变(CIN)、宫颈鳞癌中的表达逐渐增高; 在 CIN I、CIN II、CIN III 中的表达也逐渐增高; S100A9 的表达与宫颈鳞癌的组织分化程度密切相关, 分化程度越高, 其表达也越高; S100A9 在宫颈鳞癌的癌变过程中起了重要的作用, 且与宫颈鳞癌的组织分化密切相关。亦有研究发现 S100A9 蛋白在细胞分化、增殖与代谢中具有重要功能, 在结肠癌发生的早期起着关键作用^[14]。Németh 等^[15]发现, 在与炎症相关的肝癌发生过程中, S100A8 和 S100A9 是 NF- κ B 的新靶基因, 其共表达增加可活化 ROS 依赖的信号通路, 并抑制细胞凋亡, 从而促进细胞恶性进展。刘迎福等^[16]报道, S100A9 在有转移的肺腺癌组织中的表达较无转移的肺腺癌组织明显上调, S100A9 在淋巴结转移性癌组织中表达与有转移的肺腺癌原发灶相比, 无显著性差异, 认为 S100A9 可能在肺腺癌的转移启动或早期阶段发挥着积极的作用。还有文献报道, S100A9 在胃癌的侵袭转移过程起重要作用^[17]。我们研究发现, S100A9 的表达在支气管上皮癌变的进程中进行性上调, 说明 S100A9 蛋白在支气管上皮的癌变过程中可能起到了重要作用, 与肺鳞癌的发生、发展密切相关, 有可能成为早期诊断肺鳞癌的潜在标志物。已有研究报道, 上皮性卵巢癌中 S100A9 的表达明显高于正常卵巢组织和良性上皮性卵巢肿瘤, 认为 S100A9 可能参与了上皮性卵巢肿瘤的发生、发展过程, 有望成为一个新的卵巢肿瘤早期诊断的指标^[18]。这与我们的研究结果相类似。总之, S100A9 在肿瘤的癌变及演变过程中发挥着关键作用。本研究结果表明, S100A9 的表达水平与人支气管上皮癌变的进程相关, 提示

S100A9 参与了支气管上皮的癌变过程, 与肺鳞癌的发生有关, 并可能在肺鳞癌的发病机制中担任了重要角色, 但其具体作用机制尚有待进一步研究。

肌酸激酶(creatine kinase, CK)是细胞代谢过程中重要的催化酶。CK 能够催化磷酸基团在二磷酸腺苷(ADP)和磷酸肌酸间的可逆性转移, 在细胞能量代谢过程中发挥重要作用^[19]。CKB 是 CK 家族的成员之一, 其基因定位于 14q32.3, 其长度为 1 386 bp, 包含 8 个外显子和 7 个内含子^[20]。CKB 在大肠癌和肾癌等肿瘤中的表达均下调^[21-22]。在前列腺癌中, CKB 的表达较良性组织显著上调, 并且 CKB 的表达受雄激素调节, 在前列腺的癌变中可能发挥重要作用^[23]。对脑部疾病舞蹈症的研究发现, CKB 随着疾病进展表达下调, 且血中 CKB 水平也随着降低, 认为 CKB 是舞蹈症的早期疾病标志分子, 可用来监视疾病进展和评估治疗效果^[24]。Joseph 等^[25]研究发现, 在正常肺组织中 CK-BB 是最主要的 CK 同工酶, 结肠癌、肺腺癌、肺鳞癌组织中 CKB 的活性低于其相应的正常组织, 而肺良性肿瘤中的活性高于正常肺组织。Coolen 等^[26]认为血浆中 CKB 含量的变化可作为某些肿瘤诊断和转移的标志物。Han 等^[27]发现 AQP5、ARTN、CKB、MCM3、TAF9、和 TGIF2 6 个蛋白质在肺癌病人血浆中的表达水平低于健康人水平, 并且认为这 6 个蛋白质可作为预测肺癌的潜在标志物。我们研究发现, 从正常支气管上皮、鳞状化生、不典型增生/原位癌到浸润性肺鳞癌这一支气管上皮癌变过程中, CKB 的表达水平逐步下调, 这表明 CKB 表达下调是支气管上皮癌变过程中的早期事件, 与肺鳞癌的发生密切相关。CKB 有可能成为早期诊断肺鳞癌的潜在分子标志物。但 CKB 在肺鳞癌发生发展中的作用机制还需进一步研究。

本研究首次以 LCM 纯化的人支气管上皮癌变各阶段组织为研究对象, 采用新兴的 iTRAQ 标记结合 2D LC-MS/MS 定量蛋白质组学技术, 筛选了 102 个与人支气管上皮癌变相关的差异蛋白质。这些差异蛋白质中, 有的在支气管上皮癌变的早期就有表达改变, 且其表达变化与支气管上皮的癌变进程相关, 它们有可能成为肺鳞癌早期诊断的潜在分子标志物。利用后基因组时代的技术与手段, 进一步深入研究这些蛋白质在人支气管上皮癌变进程中的生物学功能, 可阐明人支气管上皮癌变的分子机制, 为肺鳞癌的发病机制研究提供新线索。

参 考 文 献

- [1] Sekido Y. Tumor markers for lung neoplasm. *Nippon Rinsho*, 2002, **60**(5): 229–232
- [2] Tseng R C, Hsieh F J, Hsu H S, *et al.* Minimal deletion regions in lung squamous cell carcinoma: association with abnormality of the DNA double-strand break repair genes and their applications on gene identification and prognostic biomarkers. *Lung Cancer*, 2008, **59**(3): 332–339
- [3] Bai X Y, Shen H. Mutational analysis of thyroid transcription factor-1 gene (TTF-1) in lung carcinomas. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2008, **44**(1): 17–25
- [4] Zhang H, Li N, Chen Y, *et al.* Protein profile of human lung squamous carcinoma cell line NCI-H226. *Biomed Environ Sci*, 2007, **20**(1): 24–32
- [5] Dowling P, O'Driscoll L, Meleady P, *et al.* 2-D difference gel electrophoresis of the lung squamous cell carcinoma versus normal sera demonstrates consistent alterations in the levels of ten specific proteins. *Electrophoresis*, 2007, **28**(23): 4302–4310
- [6] Wu X, Xiao Z, Chen Z, *et al.* Differential analysis of two-dimension gel electrophoresis profiles from the normal-metaplasia-dysplasia-carcinoma tissue of human bronchial epithelium. *Pathol Int*, 2004, **54**(10): 765–773
- [7] Li D J, Deng G, Xiao Z Q, *et al.* Identifying 14-3-3 sigma as a lymph node metastasis-related protein in human lung squamous carcinoma. *Cancer Lett*, 2009, **279**(1): 65–73
- [8] Zeng G Q, Zhang P F, Deng X, *et al.* Identification of candidate biomarkers for early detection of human lung squamous cell cancer by quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 2012, **11** (6): M111.013946
- [9] Wu W W, Wang G, Baek S J, *et al.* Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, using 2D Gel or LC MALDI TOF/TOF. *J Proteome Res*, 2006, **5** (3): 651–658
- [10] Hermani A, Hess J, De Servi B, *et al.* Calcium-binding proteins S100A8 and S100A9 as novel diagnostic markers in human prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 2005, **11**(14): 5146–5152
- [11] Koskimaa H M, Kurvinen K, Costa S, *et al.* Molecular markers implicating early malignant events in cervical carcinogenesis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2010, **19**(8): 2003–2012
- [12] Ichikawa M, Williams R, Wang L, *et al.* S100A8/A9 activate key genes and pathways in colon tumor progression. *Mol Cancer Res*, 2011, **9**(2): 133–148
- [13] 朱雪洁, 郑飞云, 邹双微, 等. S100A9 在宫颈鳞癌癌变过程中的表达及意义. *实用医学杂志*, 2010, **26**(8): 1350–1352
Zhu X J, Zheng F Y, Zhou S W, *et al.* *J Practical Medicine*, 2010, **26**(8): 1350–1352
- [14] F Lam F, Jankova L, Dent O F, *et al.* Identification of distinctive protein expression patterns in colorectal adenoma. *Proteomics Clin Appl*, 2010, **4**(1): 60–70
- [15] Németh J, Stein I, Haag D, *et al.* S100A8 and S100A9 are novel nuclear factor kappa B target genes during malignant progression of murine and human liver carcinogenesis. *Hepatology*, 2009, **50**(4): 1251–1262
- [16] 刘迎福, 肖志强, 张鹏飞, 等. 人原发性肺腺癌转移相关分子的定量蛋白质组学研究. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(4): 448–457
Liu Y F, Xiao Z Q, Zhang P F, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(4): 448–457
- [17] Yong H Y, Moon A. Roles of calcium-binding proteins, S100A8 and S100A9, in invasive phenotype of human gastric cancer cells. *Arch Pharm Res*, 2007, **30**(1): 75–81
- [18] 李 波, 崔竹梅, 郑 烨. 上皮性卵巢肿瘤组织 S100A9 表达及临床意义. *齐鲁医学杂志*, 2010, **25**(4): 286–288
Li B, Cui Z M, Zheng Y. *Medical J Qilu*, 2010, **25**(4): 286–288
- [19] Bessman S P, Carpenter C L. The creatine-creatine phosphate energy shuttle. *Annu Rev Biochem*, 1985, **54**(8): 831–862
- [20] Bengner J C, Teshima I, Walter M A, *et al.* Localization and genetic linkage of the human immunoglobulin heavy chain genes and the creatine kinase brain (CKB) gene: identification of a hot spot for recombination. *Genomics*, 1991, **9**(4): 614–622
- [21] Tom R, Lauren T, Damien M, *et al.* Consequence of Gastrin-Releasing peptide receptor activation in a human colon cancer cell line: a proteomic approach. *J Proteome Res*, 2006, **5**(6): 1460–1468
- [22] Siu K W, DeSouza L V, Scorilas A, *et al.* Differential protein expressions in renal cell carcinoma: New biomarker discovery by mass spectrometry. *J Proteome Res*, 2009, **8**(8): 3797–3807
- [23] Glen A, Gan C S, Hamdy F C, *et al.* iTRAQ-facilitated proteomic analysis of human prostate cancer cells identifies proteins associated with progression. *J Proteome Res*, 2008, **7**(3): 897–907
- [24] Kim J, Amante D J, Moody J P, *et al.* Reduced creatine kinase as a central and peripheral biomarker in Huntington's disease. *Biochim Biophys Acta*, 2010, **1802**(7–8): 673–681
- [25] Joseph J, Cardesa A, Carreras J. Creatine kinase activity and isoenzymes in lung, colon and liver carcinomas. *British J Cancer*, 1997, **76**(5): 600–605
- [26] Coolen R B, Pragay D A, Nosanchuk J S, *et al.* Elevation of brain-type creatine kinase in serum from patients with carcinoma. *Cancer*, 1979, **44**(4): 1414–1418
- [27] Han M K, Oh Y H, Kang J, *et al.* Protein profiling in human sera for identification of potential lung cancer biomarkers using antibody microarray. *Proteomics*, 2009, **9**(24): 5544–5552

Quantitative Proteomic Study for Various Stage Tissues of Human Bronchial Epithelial Carcinogenesis by Laser Capture Microdissection*

ZENG Gu-Qing¹⁾, CHENG Ai-Lan³⁾, YI Hong²⁾, LI Mao-Yu²⁾, LI Guo-Qing³⁾, LI Jian-Ling^{2)**}, LIAO Li^{1)**}

¹⁾ School of Nursing, University of South China, Hengyang 421001, China;

²⁾ Key Laboratory of Cancer Proteomics of Chinese Ministry of Health, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China;

³⁾ Cancer Research Institute, University of South China, Hengyang 421001, China)

Abstract To analyze the differentially expressed proteins in bronchial epithelial carcinogenesis process and discover novel biomarkers for early detection of human lung squamous cell cancer (LSCC), iTRAQ-tagging combined with 2D LC-MS/MS analysis was used to identify differentially expressed proteins in human bronchial epithelial carcinogenic process using laser capture microdissection-purified normal bronchial epithelium (NBE), squamous metaplasia (SM), atypical hyperplasia (AH), carcinoma *in situ* (CIS) and invasive LSCC. As a result, 1 036 proteins and 102 differentially expressed proteins were identified. Among these differentially expressed proteins, some proteins are progressively upregulated, some proteins are progressively downregulated in human bronchial epithelial carcinogenic process, and the other proteins are upregulated or downregulated in a certain stage of the process of carcinogenesis. Functional analysis and subcellular localization were performed on 102 differentially expressed proteins. Functional analysis showed that these differentially expressed proteins were associated with metabolic process, apoptosis, cell proliferation, cell differentiation, signal transduction, transcription, translation, cell adhesion, immune response, and development. Western blotting and immunohistochemistry were performed to detect the expression levels of the two proteins (S100A9 and CKB) in NBE, SM, AH, CIS and invasive LSCC, which also support the findings in MS analysis. The results suggest that these differentially expressed proteins associated with bronchial epithelial carcinogenesis, and they may be early diagnostic marker of lung squamous cell carcinoma. We further study the biological function of the differentially expressed proteins, will help to elucidate the bronchial epithelial carcinogenesis mechanism, and provide new ideas for early diagnosis and pathogenesis research of LSCC.

Key words human bronchial epithelial carcinogenesis, lung squamous carcinoma, biological biomarkers, laser capture microdissection, isobaric tags for relative and absolute quantitation

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00474

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (81272959, 81072198) and Natural Science Foundation of Hunan Province, China (12JJ6080).

**Corresponding author.

LI Jian-Ling, Tel: 86-731-84327334, Fax: 86-731-84327332, E-mail: jianlingli@yahoo.com

LIAO Li, Tel: 86-734-8281809, Fax: 86-734-8281344, E-mail: liaoli201@yahoo.com.cn

Received: September 26, 2012 Accepted: December 26, 2012

附录

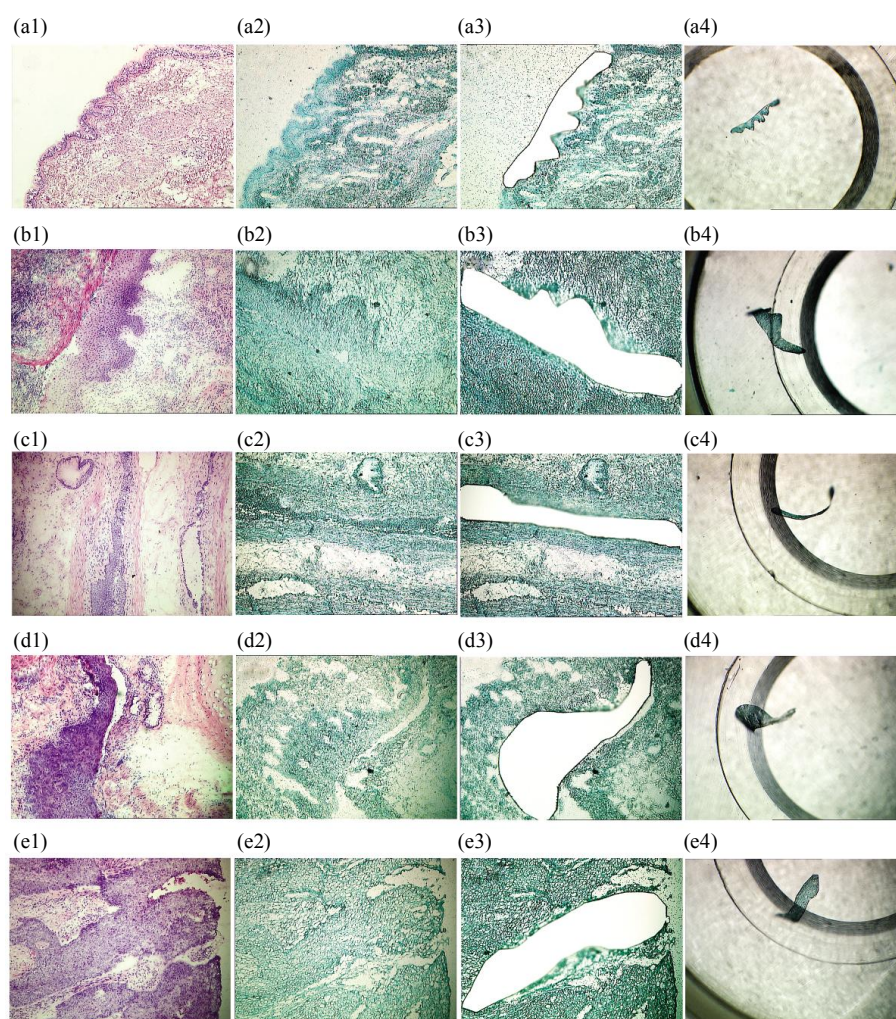


Fig. S1 Purification of human bronchial epithelial carcinogenic tissues by LCM

HE staining of NBE (a1), NBE before (a2) and after (a3) LCM, and captured NBE cells (a4). HE staining of SM(b1), SM before (b2) and after (b3) LCM, and captured SM cells (b4). HE staining of AH (c1), AH before (c2) and after(c3) LCM, and captured AH cells (c4). HE staining of CIS(d1), CIS before (d2) and after (d3) LCM, and captured CIS cells (d4). HE staining of LSCC(e1), LSCC before (e2) and after (e3) LCM, and captured LSCC cells (e4).

Table S1 Differentially expressed proteins during bronchial epithelial carcinogenesis

No.	Accession No.	Protein name	Unused	% Cov (95)	Peptides (95%)	NBE <i>vs.</i> SM	SM <i>vs.</i> AH/CIS	AH/CIS <i>vs.</i> LSCC	NBE <i>vs.</i> LSCC
1	IPI00640817.1	AK1 Adenylate kinase 1	2.01	11	2			↑ 13.796	↑ 25.104
2	IPI00795633.1	CLU	6	7.4	3			↑ 21.293	↑ 22.85
3	IPI00022977.1	Creatine kinase B-type	8	25.5	6	↑ 2.576	↑ 2.372	↑ 5.840	↑ 22.071
4	IPI00807545.1	Isoform 3 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	9.84	20.9	7			↑ 22.728	↑ 21.953
5	IPI00554648.3	Type II cytoskeletal 8	61.66	64.6	38		↑ 1.866	↑ 15.184	↑ 21.377
6	IPI00294739.1	SAM domain and HD domain-containing protein 1	8.17	12	5	↑ 1.558			↑ 19.613
7	IPI00000816.1	14-3-3 protein epsilon	5.23	30.2	4			↑ 13.096	↑ 16.565
8	IPI00554788.5	Type I cytoskeletal 18	26.61	47.7	19			↑ 10.365	↑ 14.101
9	IPI00007427.2	AGR2	12.1	38.5	6		↑ 4.492	↑ 6.054	↑ 14.088
10	IPI00024915.2	Isoform mitochondrial of peroxiredoxin-5	15.72	37.4	8	↑ 2.128	↑ 4.058		↑ 13.8
11	IPI00847342.1	Keratin 7	20.23	47.3	16			↑ 11.397	↑ 13.664
12	IPI00152295.1	Spermatogenesis-associated protein 18	6.21	13.6	5	↑ 3.627		↑ 1.804	↑ 12.957
13	IPI00553177.1	Isoform 1 of Alpha-1-antitrypsin precursor	24.43	38	14			↑ 15.337	↑ 12.862
14	IPI00887291.1	Hypothetical LOC729659	2	15.7	2			↑ 13.996	↑ 10.526
15	IPI00027463.1	Protein S100-A6	6.7	64.4	7	↑ 1.566		↑ 4.461	↑ 9.869
16	IPI00009123.1	Nucleobindin-2 precursor	3.52	14.1	4		↑ 4.263		↑ 9.796
17	IPI00872684.1	EZR 69 kDa protein	19.09	28.7	16	↑ 1.826		↑ 4.613	↑ 9.195
18	IPI00745872.2	Isoform 1 of serum albumin precursor	55.02	55.2	43		↑ 2.029	↑ 4.002	↑ 8.322
19	IPI00654709.1	ALDH3A1 protein (Fragment)	5.72	18.8	8				↑ 8.193
20	IPI00219757.13	Glutathione S-transferase P	15.71	65.7	9	↑ 2.451	↑ 1.954	↑ 1.971	↑ 8.054
21	IPI00022204.2	Isoform 1 of Serpin B3	28.8	58.5	23		↑ 2.968		↑ 7.684
22	IPI00291005.8	Malate dehydrogenase	4.17	15.9	4				↑ 6.101
23	IPI00414320.1	Annexin A11	2.73	10.7	4		↑ 2.286		↑ 6.03
24	IPI00000105.4	Major vault protein	14.65	19.7	11		↑ 1.595	↑ 4.683	↑ 5.967
25	IPI00455383.4	Isoform 2 of clathrin heavy chain 1	21.71	14.1	12			↑ 5.243	↑ 5.639
26	IPI00329801.12	Annexin A5	22.1	47.2	12	↑ 2.365	↓ 0.639	↑ 3.831	↑ 5.297
27	IPI00022200.2	alpha 3 type VI collagen isoform 1 precursor	65.33	21.7	47		↑ 1.959		↑ 4.922
28	IPI00792011.1	Calcyphosin	5.52	19.6	5	↑ 4.478			↑ 4.708
29	IPI00745729.2	SELENBP1 54 kDa protein	2.15	4.7	2	↑ 1.555	↑ 1.770	↑ 1.906	↑ 4.488
30	IPI00180675.4	Tubulin alpha-1A chain	25.54	46.3	18	↑ 2.233			↑ 4.472
31	IPI00018219.1	Transforming growth factor-beta-induced protein ig-h3 precursor	8.83	12.5	5	↓ 0.539			↑ 4.28
32	IPI00644087.1	LMNA Progerin	20.74	31.8	19			↑ 4.717	↑ 4.163
33	IPI00216691.5	Profilin-1	8.96	50.7	7				↑ 3.993
34	IPI00010471.5	Plastin-2	10.53	19.3	8			↑ 2.728	↑ 3.799
35	IPI00291136.4	Collagen alpha-1(VI) chain precursor	14.25	16.2	12				↑ 3.531
36	IPI00022793.5	Trifunctional enzyme subunit beta	5.25	10.6	3				↑ 3.464
37	IPI00003865.1	Isoform 1 of Heat shock cognate 71 kDa protein	24.85	32.4	19				↑ 3.308
38	IPI00218918.5	Annexin A1	24.28	54.1	17			↑ 4.724	↑ 3.121
39	IPI00465431.7	Galectin-3	4.45	30	6		↑ 1.614	↑ 1.665	↑ 3.092
40	IPI00017704.3	Coactosin-like protein	2.04	11.3	2			↑ 3.058	↑ 3.002
41	IPI00465084.6	Desmin	6.8	20	8			↑ 2.987	↑ 2.945
42	IPI00027444.1	Leukocyte elastase inhibitor	2.7	12.7	5	↓ 0.578		↑ 1.659	↑ 2.87
43	IPI00183695.9	Protein S100-A10	1.63	14.4	2	↓ 0.488	↓ 0.430	↑ 5.345	↑ 2.844
44	IPI00853547.1	Glucose-6-phosphate dehydrogenase isoform a	3.76	4.6	2		↓ 0.486	↑ 7.099	↑ 2.717
45	IPI00440493.2	ATP synthase subunit alpha	21.49	42.5	19			↑ 2.017	↑ 2.483
46	IPI00411704.9	Isoform 1 of Eukaryotic translation initiation factor 5A-1	4	33.8	5				↑ 2.48
47	IPI00027107.5	Tu translation elongation factor, mitochondrial precursor	9.05	18.5	8				↑ 2.314
48	IPI00303476.1	ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor	30.4	56.5	20			↑ 2.102	↑ 2.273
49	IPI00020599.1	Calreticulin precursor	14.09	35	10				↑ 2.211

								Continued	
No.	Accession No.	Protein name	Unused	% Cov (95)	Peptides (95%)	NBE <i>vs.</i> SM	SM <i>vs.</i> AH/CIS	AH/CIS <i>vs.</i> LSCC	NBE <i>vs.</i> LSCC
50	IPI00472724.1	Elongation factor 1-alpha-like 3	10.01	34.2	11			↑ 3.911	↑ 2.163
51	IPI00014898.2	Isoform 1 of Plectin-1	42.78	14.8	44			↑ 2.325	↑ 2.008
52	IPI00220766.5	Lactoylglutathione lyase	2	10.9	2			↑ 1.681	↑ 1.767
53	IPI00450768.7	Type I cytoskeletal 17	31.79	60	26	↓ 0.308	↓ 0.120	↑ 18.003	↑ 1.658
54	IPI00375145.1	Isoform Short of Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 5	2.43	4	2			↑ 2.116	↑ 1.59
55	IPI00009032.1	Lupus La protein	4.35	13.7	4				↑ 1.526
56	IPI00296534.1	Isoform D of Fibulin-1 precursor	2.01	3.6	2	↑ 1.561		↓ 0.527	↓ 0.659
57	IPI00218319.3	Isoform 2 of Tropomyosin alpha-3 chain	14.61	44	13				↓ 0.637
58	IPI00003519.1	116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	3.3	3	4			↓ 0.560	↓ 0.588
59	IPI00658109.1	LOC100133623 Creatine kinase	6.1	19.9	4				↓ 0.585
60	IPI00848342.1	Lactotransferrin precursor	2	9.6	4				↓ 0.559
61	IPI00291006.1	Malate dehydrogenase	6	18.3	4	↓ 0.628			↓ 0.551
62	IPI00027497.5	Glucose-6-phosphate isomerase	11.04	7.2	6	↑ 1.593	↓ 0.472		↓ 0.55
63	IPI00796333.1	ALDOA 45 kDa protein	6	27.8	7			↓ 0.409	↓ 0.534
64	IPI00748905.1	NAPB protein	2	15.4	2				↓ 0.528
65	IPI00024284.4	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein precursor	6.01	1.4	2		↓ 0.664	↓ 0.466	↓ 0.518
66	IPI00747533.2	PGD 56 kDa protein	6.54	17.7	6				↓ 0.514
67	IPI00011654.2	Tubulin beta chain	8.05	57.2	23	↓ 0.544			↓ 0.491
68	IPI00465315.6	Cytochrome c	5.35	24.8	3			↓ 0.598	↓ 0.481
69	IPI00026230.1	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	7.16	12.3	3	↓ 0.552		↓ 0.572	↓ 0.466
70	IPI00003362.2	HSPA5 protein	20.39	31.9	16			↓ 0.333	↓ 0.46
71	IPI00295400.1	Tryptophanyl-tRNA synthetase	7.22	15.1	5	↑ 2.413		↓ 0.227	↓ 0.459
72	IPI00746438.2	Isoform 2 of 60S ribosomal protein L11	1.81	15.8	2				↓ 0.458
73	IPI00294834.6	Aspartyl/asparaginyl beta-hydroxylase	4.7	7.7	3				↓ 0.412
74	IPI00789551.1	Uncharacterized protein MATR3	6	6.7	4			↓ 0.264	↓ 0.393
75	IPI00015842.1	Reticulocalbin-1 precursor	2.09	13	2			↓ 0.367	↓ 0.374
76	IPI00644989.2	Isoform 1 of Protein disulfide-isomerase A6 precursor	11.43	28	8			↓ 0.382	↓ 0.364
77	IPI00646656.2	Asparaginyl-tRNA synthetase variant (Fragment)	4	6.2	2			↓ 0.330	↓ 0.359
78	IPI00642971.3	Eukaryotic translation elongation factor 1 delta isoform 1	4.74	5.9	4			↓ 0.519	↓ 0.35
79	IPI00007047.1	Protein S100-A8	4.35	37.6	3	↓ 0.481	↓ 0.508		↓ 0.35
80	IPI00009866.6	Type I cytoskeletal 13	11.29	35.2	9	↓ 0.033	↑ 1.609		↓ 0.314
81	IPI00219018.7	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	29.79	55.2	21	↓ 0.371			↓ 0.307
82	IPI00024933.3	60S ribosomal protein L12	3.55	18.8	2			↓ 0.453	↓ 0.298
83	IPI00300725.7	Type II cytoskeletal 6A	24.48	44	21	↓ 0.032	↓ 0.268	↑ 19.069	↓ 0.293
84	IPI00021347.1	Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3	3.4	46.1	4	↑ 1.963	↓ 0.192	↓ 0.313	↓ 0.29
85	IPI00018873.1	Isoform 1 of Nicotinamide phosphoribosyltransferase	7.08	21.2	6		↓ 0.170		↓ 0.285
86	IPI00021926.2	26S protease regulatory subunit S10B	2	8.4	2	↓ 0.446		↓ 0.322	↓ 0.281
87	IPI00887678.1	LOC654188 similar to peptidylprolyl isomerase A-like	13.35	32.3	8	↓ 0.434		↓ 0.570	↓ 0.27
88	IPI00013933.2	Isoform DPI of Desmoplakin	41.5	16.4	33	↓ 0.328	↓ 0.465		↓ 0.269
89	IPI00549725.6	Phosphoglycerate mutase 1	2	14.2	3		↑ 2.391	↓ 0.171	↓ 0.239
90	IPI00032140.4	Serpin H1 precursor	8.62	22.3	5			↓ 0.298	↓ 0.231
91	IPI00738499.2	Ferritin light chain	3	8.6	2			↓ 0.283	↓ 0.225
92	IPI00218988.4	Isoform 2 of Adenylate kinase isoenzyme 2, mitochondrial	2.06	10.8	2	↓ 0.402		↓ 0.237	↓ 0.22
93	IPI00453473.6	Histone H4	9.76	42.7	7	↓ 0.371	↓ 0.118		↓ 0.206
94	IPI00017334.1	Prohibitin	9.96	44.1	8			↓ 0.240	↓ 0.188
95	IPI00375746.4	Isoform 1 of Guanylate-binding protein 6	2	4.8	2	↓ 0.538	↓ 0.621	↓ 0.526	↓ 0.181
96	IPI00217963.3	Type I cytoskeletal 16	16.33	44.6	13	↑ 2.112	↓ 0.037	↑ 2.530	↓ 0.14
97	IPI00010214.1	Protein S100-A14	2	18.6	2	↓ 0.273		↓ 0.501	↓ 0.126
98	IPI00411765.3	Isoform 2 of 14-3-3 protein sigma	10.29	39.8	6	↓ 0.078	↓ 0.608	↑ 2.067	↓ 0.106
99	IPI00027462.1	Protein S100A9	10.03	64	8	↓ 0.148	↓ 0.380	↓ 0.640	↓ 0.064
100	IPI00025512.2	Heat shock protein beta-1	8.41	58.5	6	↓ 0.275	↓ 0.574	↓ 0.205	↓ 0.05
101	IPI00221222.7	Activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15	2	18.9	2	↓ 0.276		↓ 0.197	↓ 0.05
102	IPI00029733.1	Aldo-keto reductase family 1 member C1	6.1	37.8	10		↓ 0.625	↓ 0.017	↓ 0.028