

УДК 577.2.616-006

ИДЕНТИФИКАЦИЯ БЕЛКОВ С ПОВЫШЕННЫМ УРОВНЕМ СИНТЕЗА В ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЯХ ЖЕЛУДКА: СРАВНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ДВУМЕРНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА И БИОИНФОРМАТИЧЕСКОГО ПОИСКА

© 2011 г. Е. С. Григорьева^{1*}, Ю. А. Букурова², Г. С. Краснов²,
С. Г. Афанасьев^{1,3}, Н. В. Чердынцева¹, С. А. Тузиков¹, Е. Л. Чойнзонов^{1,3},
В. Л. Карпов², Н. А. Лисицын², С. Ф. Берестень²

¹Научно-исследовательский институт онкологии Сибирского отделения
Российской академии медицинских наук, Томск, 634009

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991

³Сибирский государственный медицинский университет, Томск, 634050

Поступила в редакцию 23.08.2010 г.

Принята к печати 10.11.2010 г.

В результате сравнительного анализа уровня синтеза белков в интестинальных и диффузных опухолях желудка и в нормальных тканях, выполненного методом двумерного гель-электрофореза, идентифицированы три белка (SOD2, S100A6 и TXN), содержание которых в опухолях значительно выше, чем в нормальных тканях. При этом повышение уровня синтеза белков SOD2 и TXN гораздо чаще наблюдается в диффузных опухолях, чем в интестинальных. На основе опубликованных данных отобрана контрольная панель из 11 белков, содержание которых, согласно данным двумерного электрофореза, в опухолях желудка заметно выше, чем в нормальных тканях. Биоинформатический поиск мРНК, кодирующих белки из контрольной панели, в базе данных Oncomine, содержащей результаты определения уровней транскрипции мРНК в нормальных и опухолевых тканях, выявил совпадение данных протеомного и транскриптомного анализа для семи из 11 белков.

Ключевые слова: рак желудка, протеомика, биоинформатика, протеомные маркеры опухолей.

IDENTIFICATION OF PROTEINS OVEREXPRESSED IN MALIGNANT GASTRIC TUMORS: COMPARISON OF THE RESULTS OF 2-DE AND BIOINFORMATICS SEARCH, by E. S. Grigorieva^{1*}, Yu. A. Bukurova², G. S. Krasnov², S. G. Afanasyev^{1,3}, N. V. Cherdyntseva¹, E. L. Choinzonov^{1,3}, V. L. Karpov², N. A. Lisitsyn², S. F. Beresten² (¹Tomsk Cancer Research Institute, Siberian Division, Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk, 634009 Russia; *e-mail: grigorieva@oncology.tomsk.ru; ²Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia; ³Siberian State Medical University, Tomsk, 634050 Russia). Comparison of protein expression in intestinal and diffuse stomach tumors by 2D gel electrophoresis led to identification of three proteins (SOD2, S100A6, and TXN), which are overexpressed in tumors as compared to normal controls. It was shown, that overexpression of proteins SOD2 and TXN occurs much more frequently in diffuse tumors than in intestinal ones. A control panel of eleven proteins overexpressed in stomach tumors has been selected based on the data of comparative 2D analysis described in the literature. Bioinformatics search for mRNAs encoding proteins from the control panel in Oncomine database (which contains the results of determination of mRNA transcription level in tumor vs. normal samples) demonstrated the coincidence of proteomic and transcriptomic data for seven out of 11 proteins.

Keywords: gastric cancer, proteomics, bioinformatics, proteomic markers of tumors.

Рак желудка (РЖ) — наиболее распространенная злокачественная опухоль желудка, занимающая первое место среди всех опухолей желудочно-кишечного тракта, и главная причина смертности от онкологических заболеваний на протяжении боль-

шей части XX века [1]. В наши дни ежегодно в мире регистрируется более миллиона новых случаев РЖ, и более 50000 из них — в Российской Федерации. Особенно высокий уровень смертности от РЖ зафиксирован в Японии, странах Восточной Европы,

Принятые сокращения: РЖ — рак желудка; 2DE — двумерный гель-электрофорез; БД — база данных.

* Эл. почта: grigorieva@oncology.tomsk.ru

Латинской Америки и Африки. Факторами риска развития РЖ являются: возраст (более 60 лет), атрофический гастрит и интестинальная метаплазия, пониженный уровень пепсиногена в крови, группа крови типа А, пол (риск вдвое выше у мужчин), курение, тучность, особенности питания (частое употребление копченой рыбы) и наследственные факторы (мутации в гене E-кадгерина, а также в других, пока не идентифицированных генах). Пятилетняя выживаемость при РЖ варьирует от 5 до 15%, рецидивы опухоли отмечаются у 80% больных, при этом 56% больных умирают в течение первого года после постановки диагноза. Это связано с высоким уровнем запущенности, обусловленным скрытым течением заболевания (без выраженной симптоматики), отсутствием программ активного выявления (скрининга) и чувствительных методов молекулярной диагностики, которые позволяли бы распознавать злокачественный процесс на ранних стадиях. В настоящее время в клинической практике ограничено применяется лишь несколько диагностических тестов РЖ. Часть из них основана на определении поверхностных белковых маркеров опухолевых клеток (например, СА 19.9 и DR70), однако такие тесты имеют низкую специфичность. Один тест позволяет идентифицировать методом ПЦР метастатические клетки в перитонеальной жидкости на поздних стадиях заболевания [2]. Большинство злокачественных опухолей желудка – это аденокарциномы, которые согласно классификации Laugen подразделяют на два основных гистологических подтипа: интестинальный (кишечный) и диффузный, различающиеся по агрессивности клинического течения [3]. Интестинальные опухоли характеризуются сохранностью железистых структур эпителия, микроскопически напоминающих железы слизистой кишечника с многочисленными протоками. Клетки РЖ диффузного типа не связаны между собой и не образуют отдельных опухолевых узлов в стенке желудка, обладают ползущим инфильтративным ростом, при этом злокачественный процесс протекает более агрессивно и имеет худший прогноз, чем в случае опухолей интестинального типа. У 8–10% больных диффузным РЖ обнаруживается генетическая предрасположенность к развитию этого заболевания [4].

Применение методов сравнительной протеомики открывает возможность идентификации белковых онкомаркеров, уровень синтеза которых наиболее заметно и наиболее часто различается в опухолевых и нормальных тканях. Этот подход основан на фракционировании белков нормальных и опухолевых тканей, идентификации белков с заметно измененным уровнем синтеза в опухолях с помощью масс-спектрометрии и отборе секреторных белков, представленных в базах данных (БД).

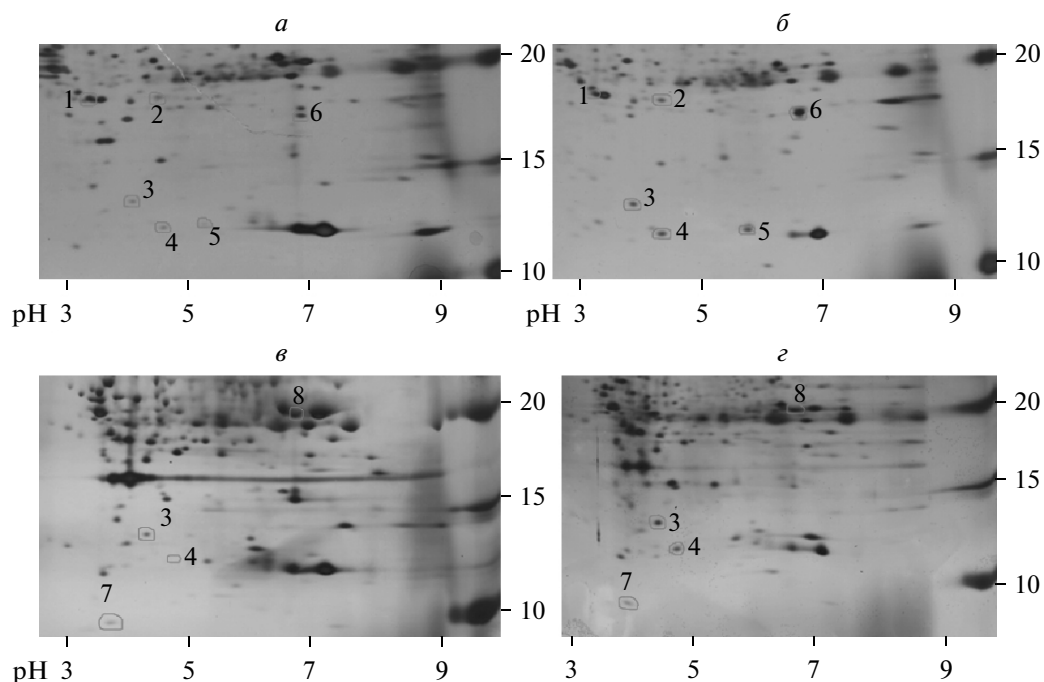
Получение антител к секреторным белкам с повышенным уровнем синтеза в опухолях открывает возможность создания высокочувствительных се-

рологических тестов для диагностики, послеоперационного мониторинга и прогнозирования течения заболевания. В представленной работе с использованием разработанной нами модификации метода двумерного гель-электрофореза (2DE) [5] проведен сравнительный анализ протеомов РЖ интестинального и диффузного типа и нормальных тканей, а также определена эффективность поиска белковых маркеров РЖ методами 2DE и биоинформатического поиска в транскриптомной БД Oncomine [6].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Экстракция белков и 2DE-анализ экстрактов тканей. Образцы РЖ (всего 11, из которых пять – интестинальная форма и шесть диффузная, стадии $T_{1-4}N_{0-1}M_0$), полученные после резекции, максимально быстро замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C . Клинический диагноз подтверждали морфологическим исследованием в отделении патологической анатомии и цитологии НИИ онкологии (г. Томск). Отсутствие опухолевых клеток в образцах нормальных тканей, удаленных от опухоли на 7–10 см, подтверждали гистологическим анализом. Ткани гомогенизировали и экстрагировали белковую фракцию солевым буфером согласно предложенному нами ранее протоколу [5]. Концентрацию белка в экстрактах определяли по методу Бредфорд [7]. 2DE проводили согласно стандартному протоколу [8]. На трубку наносили 100 мкг белка и проводили изоэлектрофокусировку в направлении кислого буфера (300 В, 16 ч). Столбики геля извлекали из трубок, промывали в течение 40 мин в буфере Лэммли и замораживали при -80°C . Разделение во втором направлении проводили в градиентном полиакриламидном геле (10–22%) при 25 мА в течение 16 ч. После электрофореза гели окрашивали солями серебра [9]. Электрофореграммы сканировали на приборе Epson Perfection V750 Pro, позволяющем получать изображения прозрачных объектов в видимом диапазоне с разрешением 4800 dpi.

Белковые пятна идентифицировали масс-спектрометрически на tandemном MALDI-TOF/TOF спектрометре Ultraflex II (“Bruker Daltonics”, Германия), оснащенном УФ-лазером (Nd). Кусочки геля дважды промывали в 100 мкл 40%-го раствора ацетонитрила в 0.1 М NH_4HCO_3 (30 мин, 37°C), после удаления раствора гели дегидратировали, добавляя 100 мкл ацетонитрила. Ацетонитрил удаляли, образцы высушивали и добавляли 3 мкл раствора модифицированного трипсина (“Promega”, 15 мкг/мл в 0.05 М NH_4HCO_3). Образцы инкубировали в течение 12 ч при 37°C и добавляли 7 мкл 0.5%-ной трифторуксусной кислоты (ТФУ) в 10%-ном водном растворе ацетонитрила. На мишени смешивали 2 мкл надгелевого раствора и 0.3 мкл раствора 2,5-дигидробензойной кислоты (“Aldrich”, 20 мг/мл в 20%-ном водном растворе ацетонитрила с добавле-



Фрагменты двумерных электрофореграмм, полученных при разделении белков, растворимых в солевом буфере, из нормальной (*а, в*) и опухолевой (*б, г*) тканей. 4 – TXN, 6 – SOD2, 7 – S100A6; 1–3, 5, 8 – белки с повышенным уровнем синтеза в опухоли, имеющие скор-параметр менее 70.

нием 0.5% ТФУ). Смесь высушивали на воздухе. Масс-спектрометрию проводили в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона в диапазоне 700–4500 Да (общий разгоняющий потенциал в рефлекто-моду +25 кВ). Спектры фрагментации отдельных пептидов получали в тандемном режиме (Lift), при этом разгоняющий потенциал родительских ионов составлял +7 кВ, а фрагментные ионы ускорялись до 28 кВ. Точность измеренных масс после калибровки по пикам автолиза трипсина составляла минимум 0.005%, точность измеренных масс фрагментов – 1 Да. Масс-спектры обрабатывали с использованием программы FlexAnalysis 2.0 (“Bruker Daltonics”). Белки идентифицировали по “пептидному масс-фингерпринту” при помощи программы Mascot [10] в БД белков человека NCBI [11] с учетом возможного окисления остатков метионина кислородом воздуха и модификации остатков цистеина акриламидом. Идентификацию белка считали достоверной при значении скор-параметра >71 ($p < 0.05$). Если определение белка не удовлетворяло критериям надежности, то получали спектры фрагментации отдельных пептидов и проводили поиск по MS+MS/MS с использованием программы BioTools v.3 (“Bruker Daltonics”).

Биоинформатический поиск. Поиск потенциальных белковых онкомаркеров РЖ проводили с использованием транскриптомной БД Oncomine [6] и дифференциального анализа (тип сравнения норма–опухоль) в коллекции образцов опухолей желудка Чена (Chen Gastric Collection). Уровень тран-

скрипции гена в опухолях желудка определяли как отношение $\log_2 \text{MSI}$ опухолевых и нормальных тканей (т.е. приводимых в БД значениях логарифмов медианы интенсивности флуоресценции пятна).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Большинство протеомных исследований выполняется на суммарных экстрактах ткани, содержащих много структурных белков, что затрудняет выявление минорных растворимых белков. Для устранения высококопийных структурных белков мы использовали предварительную экстракцию растворимых белков тканей соевым буфером [5]. Сравнение электрофореграмм, полученных после разделения 11 пар белковых экстрактов нормальной и опухолевой тканей желудка методом 2DE, позволило обнаружить 15 белковых пятен, интенсивность которых в опухоли как минимум в 3 раза выше, чем в нормальной ткани не менее чем в четырех образцах (двумерные электрофореграммы двух пар образцов представлены на рисунке). Масс-спектрометрический анализ белковых пятен, интенсивность которых заметно различалась в нормальных и опухолевых тканях, позволил надежно идентифицировать по интегральным параметрам два белка: супероксиддисмугтазу 2 (SOD2) и S100A6 (значения параметра 73 и 72 соответственно, см. раздел Биоинформатический поиск в “Экспериментальной части”). Кроме того, проведена вероятная, но не окончательная идентификация тиоредоксина (бе-

Таблица 1. Характеристика белков, содержание которых повышено в опухолях желудка

Белок	Повторяемость*	Мол. масса, клеточная локализация	Функция	Ссылка
TXN	3/5; 6/6	11.4 кДа, цитоплазма	Оксидоредуктаза, регулятор клеточного цикла и апоптоза	[11]
SOD2	1/5; 5/6	24.7 кДа, митохондрии	Оксидоредуктаза	[12]
S100A6	4/5; 4/6	10.1 кДа, цитоплазма, ядро, мембрана	Регулятор клеточного цикла, пролиферации и дифференцировки	[13]

*Отношение количества опухолей интестинального и диффузного типа с повышенным уровнем синтеза белка к общему числу проанализированных в настоящей работе опухолей интестинального и диффузного типа соответственно.

лок TXN, значение параметра 69), повышение уровня синтеза которого в опухолях желудка описано ранее [12]. Количество идентифицированных маркеров РЖ, небольшое по сравнению с обнаруженным нами ранее методом 2DE в опухолях другой локализации (толстой кишки и щитовидной железы) [5, 15], может объясняться как высокой агрессивностью среды в полости желудка, так и резкой активизацией процессов некротического и апоптотического распада клеток через короткое время после резекции хирургического материала, что приводит к образованию многочисленных продуктов протеолиза, затрудняющих разделение и идентификацию белков.

Два из трех белков (S100A6 и TXN) секреторные, следовательно, они проникают в кровоток в процессе роста опухоли и ее некротического распада. Эти маркеры могут использоваться для сывороточной диагностики широкого спектра опухолей, поскольку заметное и частое повышение уровня синтеза белка S100A6 наблюдается при раке поджелудочной железы [16], прямой кишки [17] и легкого [18], а белка TXN – при раке прямой кишки [19]. Сравнение частоты повышения синтеза идентифицированных белков при РЖ различного гистологического подтипа показало, что уровень белков TXN и SOD2 заметно чаще повышается в диффузных опухолях, чем в интестинальных (в 2 и 4 раза соответственно), тогда как в случае белка S100A6 разница оказалась незначительной. Преимущественный синтез белка TXN в опухолях желудка недифференцированного типа ранее описали японские ученые. Согласно классификации Японского общества гастроэнтерологической эндоскопии, опухоли этого типа сходны с РЖ диффузного типа. [20]. Морфологически не всегда возможно четко определить принадлежность опухоли к кишечному или диффузному типу, что очень важно для назначения адекватной терапии, поэтому иммуногистохимический анализ уровня ассоциированных с тем или иным гистотипом белков позволит повысить эффективность дифференциальной диагностики РЖ и выбора оптимального лечения. Для того, чтобы определить прогностическую ценность TXN и SOD2, необходимо иммуногистохимически с использованием специфических антител оценить их

связь с гистологическим типом и особенностями клинического течения процесса (наличие лимфогенного и/или гематогенного метастазирования, рецидивирования) на более представительной выборке больных РЖ.

Анализ опубликованных данных показал, что из идентифицированных нами белков два – это ферменты, способные восстанавливать активные формы кислорода (в частности, перекись водорода) в цитоплазме (TXN) и митохондриях (SOD2), защищая клетки от окислительного стресса (табл. 1). В процессе иммортализации клеток значительно повышается уровень синтеза ферментов-антиоксидантов (оксидоредуктаз), что ассоциировано с резким увеличением вероятности превращения доброкачественной опухоли в злокачественную и с неблагоприятным прогнозом [21]. Повышение уровня синтеза оксидоредуктаз приводит к снятию окислительного стресса, возникающего в результате аномального кровоснабжения опухоли, а также синтеза активных форм кислорода макрофагами и гранулоцитами, инфильтрирующими опухоль. Кроме того, повышение уровня оксидоредуктаз в опухолевых клетках приводит к подавлению процессов апоптоза и некроза. Роль тиоредоксина в возникновении и прогрессии широкого спектра опухолей хорошо документирована [20–22]. Функции этого белка состоят в инактивации перекисей, переносе атомов водорода для восстановления цитоплазматических редуктаз, а также в регуляции клеточного цикла и супрессии апоптоза. Супероксиддисмутаза 2 инактивирует супероксидные радикалы, возникающие в митохондриях в результате утечки электронов из дыхательной цепи. Известно, что некоторые однонуклеотидные полиморфизмы в гене *SOD2* ассоциированы с повышенным риском возникновения целого ряда опухолей [23].

С целью сравнения эффективности идентификации белковых маркеров РЖ при помощи разработанной нами модификации метода 2DE-анализа и методов биоинформатического поиска мы отобрали панель из 11 белков, частота и величина повышения уровня синтеза которых согласно опубликованным данным наиболее выражены в РЖ (табл. 2). Данные, указывающие на повышение уровня транскрипции генов или уровня синтеза пяти из 11 бел-

Таблица 2. Идентификация белков, содержание которых повышено при раке желудка (РЖ)

Белок	Метод определения	Повышение уровня транскрипции гена/синтеза белка, частота, %*	Уровень транскрипции гена в РЖ согласно Oncomine**	Ссылка
SOD2	ПЦР-РВ, н/р	45; 55	1.7/1.4	[12]
S100A6	ПЦР-РВ, ИГХ, ВБА, н/р	50; 65; 100; 73	нд	[13]
TXN	ИГХ, н/р	80; 82	-1.7/-1.7	[11]
TMSB10	НБ	100	1.2/1.2	[23]
S100A9	2DE	31	1.1/1.2	[24]
RAB30	2DE	40	-3.1/-2.0	[25]
RGS3	2DE	40	1.2/1.2	[25]
ZNF134	2DE	40	1.3/1.6	[25]
SPP1	ПЦР-РВ	44	нд	[26]
PGK1	2DE	60	1.8/1.2	[27]
ERHA4	ПЦР-РВ, ИГХ	42; 48	1.5/1.2	[28]

* Усредненное отношение уровней транскрипции/трансляции гена в опухолях желудка и в нормальных тканях.

** Отношение логарифмов интенсивности флуоресценции в интестинальных и диффузных опухолях соответственно. Отрицательное значение соответствует понижению, а положительное повышению транскрипции мРНК в опухоли.

Примечание: н/р – настоящая работа; нд – нет данных. ИГХ – иммуногистохимический метод, ВБА – Вестерн-блот-анализ, ПЦР-РВ – ПЦР в реальном времени.

ков в опухоли, подтверждены независимыми методами (ПЦР в реальном времени, иммуногистохимические методы, Вестерн-блотинг, 2DE). Сравнительная оценка эффективности идентификации белков, активно синтезируемых при РЖ, проведенная методами 2DE и биоинформатического поиска (на основе выявления в БД Oncomine мРНК с повышенным уровнем транскрипции в опухолях) показала совпадение результатов у семи из 11 белков (табл. 2). В двух случаях БД Oncomine не содержала сведений о транскрипции гена, а для двух оставшихся генов данные были противоположными, т.е. в БД Oncomine транскрипция мРНК в опухолях снижалась по сравнению с нормой, тогда как согласно протеомному анализу уровень синтеза соответствующего белка возрастал. Результаты 2DE-анализа одного из двух оставшихся белков подтверждены иммуногистохимическим методом (табл. 2). Противоречия между результатами 2DE-анализа и БД Oncomine могут объясняться следующими причинами: 1) недостаточным количеством образцов, проанализированных методом 2DE; 2) артефактами БД Oncomine, связанными с перекрестной гибридизацией гомологичных последовательностей семейств родственных генов на микрочипах; 3) понижением уровня экспрессии микроРНК, подавляющих синтез белка на уровне трансляции в опухолевых клетках, при неизменном или сниженном уровне транскрипции мРНК-мишени [29]. Таким образом, данные биоинформатического поиска в БД Oncomine совпадают с результатами определения уровня синтеза умеренно- и высококопийных белков методом 2DE в семи из 11 случаев, что указывает на значительно более высокую эффективность использования Oncomine по

сравнению с аналогичными базами, аккумулирующими результаты анализа транскриптомов [15]. Определение статистической значимости обнаруженной корреляции потребует дополнительных исследований с использованием разработанного протокола 2DE.

Настоящая работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (08-04-13705-офи_ц) и Международного научно-технического центра (# 3909).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Alexander H.R. 1992. Cancer of the stomach. In: *Cancer: principles and practice of oncology*, vol. 1. Eds DeVita Jr. V.T., Rosenberg S.A. Philadelphia: Lippincott J.B. Comp., pp. 818–848.
- Fujiwara Y., Doki Y., Taniguchi H., Sohma I., Takiguchi S., Miyata H., Yamasaki M., Monden M. 2007. Genetic detection of free cancer cells in the peritoneal cavity of the patient with gastric cancer: present status and future perspectives. *Gastric Cancer*, **10**, 197–204.
- Katoh M. 2005. Epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer. *Int. J. Oncol.* **27**, 1677–1683.
- Hamilton S.R., Aaltonen A.A. 2000. *Pathology and genetics of tumours of the digestive system*. Lyon: IARC Press.
- Краснов Г.С., Опарина Н.Ю., Ханкин С.Л., Машкова Т.Д., Ершов А.Н., Зацепина О.Г., Карпов В.Л., Берестень С.Ф. 2009. 2-D протеомика рака толстой кишки: идентификация белков с измененным содержанием в опухоли. *Молекулярная биология*. **43**, 348–356.
- <https://www.oncomine.org>
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein uti-

- lizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
8. Laemmly U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680–685.
 9. Mortz E., Krogh T., Vorum H., Gorg A. 2001. Improved silver staining protocols for high sensitivity protein identification using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis. *Proteomics.* **1**, 1359–1363.
 10. <http://matrixscience.com>
 11. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide>
 12. Grogan T.M., Fenoglio-Prieser C., Zeheb R., Bellamy W., Frutiger Y., Vela E., Stemmerman G., Macdonald J., Richter L., Gallegos A., Powis G. 2000. Thioredoxin, a putative oncogene product, is overexpressed in gastric carcinoma and associated with increased proliferation and increased cell survival. *Hum. Pathol.* **31**, 475–481.
 13. Takeno A., Takemasa I., Doki Y., Yamasaki M., Miyata H., Takiguchi S., Fujiwara Y., Matsubara K., Monden M. 2008. Integrative approach for differentially overexpressed genes in gastric cancer by combining large-scale gene expression profiling and network analysis. *Br. J. Cancer.* **99**, 1307–1315.
 14. Yang Y.Q., Zhang L.J., Dong H., Jiang C.L., Zhu Z.G., Wu J.X., Wu Y.L., Han J.S., Xiao H.S., Gao H.J., Zhang Q.H. 2007. Upregulated expression of S100A6 in human gastric cancer. *J. Dig. Dis.* **8**, 186–193.
 15. Сипина Л.В., Букурова Ю.А., Никитина И.Г., Краснов Г.С., Сергеев С.А., Лисицын Н.А., Карпов В.Л., Берестень С.Ф. 2010. Идентификация белков с повышенным уровнем синтеза в папиллярных опухолях щитовидной железы. *Биохимия.* **75**, 1148–1152.
 16. Nedjadi T., Kitteringham N., Campbell F., Jenkins R.E., Park B.K., Navarro P., Ashcroft F., Tepikin A., Neoptolemos J.P., Costello E. 2009. S100A6 binds to annexin 2 in pancreatic cancer cells and promotes pancreatic cancer cell motility. *Br. J. Cancer.* **101**, 1145–1154.
 17. Komatsu K., Andoh A., Ishiguro S., Suzuki N., Hunai H., Kobune-Fujiwara Y., Kameyama M., Miyoshi J., Akedo H., Nakamura H. 2000. Increased expression of S100A6 (Calcyclin), a calcium-binding protein of the S100 family, in human colorectal adenocarcinomas. *Clin. Cancer Res.* **6**, 172–177.
 18. Ishii A., Suzuki M., Satomi K., Kobayashi H., Sakashita S., Kano J., Pei Y., Minami Y., Ishikawa S., Noguchi M. 2009. Increased cytoplasmic S100A6 expression is associated with pulmonary adenocarcinoma progression. *Pathol. Int.* **59**, 623–630.
 19. Raffel J., Bhattacharyya A.B., Gallegos A., Cui H., Einspahr J.G., Alberts D.S., Powis G. 2003. Increased expression of thioredoxin-1 in human colorectal cancer is associated with decreased patient survival. *J. Lab. Clin. Med.* **142**, 46–51.
 20. Noda N., Ochiai A., Miyuzaki K., Sigimura T., Terada M., Wakasigi H. 2000. Detection of thioredoxin in gastric cancer: association with histological type. *Antioxid. Redox Signal.* **2**, 519–528.
 21. Dairkee S.H., Nicolau M., Sayeed A., Champion S., Ji Y., Moore D.H., Yong B., Meng Z., Jeffrey S.S. 2007. Oxidative stress pathways highlighted in tumor cell immortalization: association with breast cancer outcome. *Oncogene.* **26**, 6269–6279.
 22. Kaimul A.M., Nakamura H., Masutani H., Jodoi J. 2007. Thioredoxin and thioredoxin-binding protein-2 in cancer and metabolic syndrome. *Free Radic. Biol. Med.* **43**, 861–868.
 23. Bag A., Bag N. 2008. Target sequence polymorphism of human manganese superoxide dismutase gene and its association with cancer risk: a review. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **17**, 3298–3305.
 24. Oien K.A., Vass J.K., Downie I., Fullarton G., Keith W.N. 2003. Profiling, comparison and validation of gene expression in gastric carcinoma and normal stomach. *Oncogene.* **22**, 4287–4300.
 25. El-Rifai W., Moskaluk C.A., Abdrabbo M.A., Herper J., Yoshida C., Riggins G.J., Frierson H.F., Powell S.M. 2002. Gastric cancers overexpress S100A calcium-binding proteins. *Cancer Res.* **62**, 6823–6826.
 26. Li W., Li J.F., Qu Y., Chen X.H., Qin J.M., Gu Q.L., Yan M., Zhu Z.G., Liu B.Y. 2008. Comparative proteomics analysis of human gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* **14**, 5657–5664.
 27. Imano M., Satou T., Itoh T., Sakai K., Ishimaru E., Yasuda A., Peng Y.F., Shinkai M., Akai F., Yasuda T., Imamoto H., Okuno K., Ito H., Shiozaki H., Ohyanagi H. 2009. Immunohistochemical expression of osteopontin in gastric cancer. *J. Gastrointest. Surg.* **13**, 1577–15782.
 28. Yoshihara T., Kadota Y., Yoshimura Y., Tatano Y., Takeuchi N., Okitsu H., Umemoto A., Yamauchi T., Itoh K. 2006. Proteomic alteration in gastric adenocarcinomas from Japanese patients. *Mol. Cancer.* **25**, 5–75.
 29. Oki M., Yamamoto H., Taniguchi H., Adachi Y., Imai K., Shinomura Y. 2008. Overexpression of the receptor tyrosine kinase EphA4 in human gastric cancers. *World J. Gastroenterol.* **14**, 5650–5656.