

S型半胱氨酸蛋白酶抑制剂对胃肠道肿瘤诊断的研究进展

王多姿¹, 何 瑜², 史丽萍²

¹西安医学院, 陕西 西安

²陕西省人民医院消化内二科, 陕西 西安

收稿日期: 2022年2月21日; 录用日期: 2022年3月13日; 发布日期: 2022年3月23日

摘 要

S型半胱氨酸蛋白酶抑制剂(S-type Cystatins)是半胱氨酸蛋白酶抑制剂超家族中家族2的成员, 包括半胱氨酸蛋白酶抑制剂SN、SA以及S, 在胃肠道恶性肿瘤的生长、侵袭转移等病理过程中发挥重要作用, 并且S-type Cystatins在肿瘤组织中的表达水平与肿瘤的生长、侵袭转移程度及预后相关, 有望成为新型的胃肠道肿瘤诊断分子标志物。本文就半胱氨酸蛋白酶抑制剂的分类、在肿瘤发生发展中的作用以及S型半胱氨酸蛋白酶抑制剂在胃肠道肿瘤诊断中的价值作一综述。

关键词

S型半胱氨酸蛋白酶抑制剂, 胃癌, 结直肠癌

Research Progress of S-Type Cystatins in the Diagnosis of Gastrointestinal Tumors

Duozi Wang¹, Yu He², Liping Shi²

¹Xi'an Medical College, Xi'an Shaanxi

²Department of Gastroenterology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an Shaanxi

Received: Feb. 21st, 2022; accepted: Mar. 13th, 2022; published: Mar. 23rd, 2022

Abstract

S-type Cystatin is a member of family 2 in the Cystatins Superfamily, including SN, SA and S, which play an important role in the growth, invasion and metastasis of gastrointestinal tumors. The expression level of S-type Cystatin in tumor tissue is related to the growth, invasion, metastasis and

prognosis of tumor, which is expected to become a new molecular marker for the diagnosis of gastrointestinal tumors. This article reviews the classification, structure, role of cystatins in tumor development and the value of S-type Cystatins in diagnosis of gastrointestinal tumors.

Keywords

S-Type Cystatins, Gastric Cancer, Colorectal Cancer

Copyright © 2022 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

全球癌症统计数据报告显示：胃癌是全球发病率第六的恶性肿瘤，死亡率与肝癌共同并列第二，而这其中约 50% 的胃癌患者在中国[1]。同时结直肠癌在我国的发病率也位居第四[2]。胃癌和结直肠癌早期特异症状均不典型，导致大部分患者确诊时已达疾病中晚期，错过最佳根治手术治疗时机，患者生存质量低、预后差、死亡率高，这就使早期筛查及诊断成为疾病治疗的重点。胃肠镜联合组织病理检测是当前最直接诊断胃肠道恶性肿瘤的检查方法，但因其为侵入性检查，普通内镜操作过程中不适程度较高，有消化道穿孔、出血、感染、窒息等风险，以及一些相对禁忌症的存在，难以成为大规模普通人群或胃肠道恶性肿瘤高危人群早期筛查的手段。近年来，有研究证明半胱氨酸蛋白酶抑制剂在早期胃肠道恶性肿瘤的诊断上有重要意义，所以本文将从半胱氨酸蛋白酶抑制剂的分类、在肿瘤发生发展中的作用以及 S 型半胱氨酸蛋白酶抑制剂在胃肠道肿瘤诊断中的价值作一概述。

2. 半胱氨酸蛋白酶抑制剂

2.1. 半胱氨酸蛋白酶抑制剂超家族

二十世纪六十年代 Fossum 与 Whitaker [3]通过层析法从鸡蛋清中首次分离提纯到一种木瓜蛋白酶和无花果蛋白酶抑制剂，但未进一步探索该种蛋白酶抑制剂的生物学特性。20 多年后，Anasatis 等[4]改良提纯方法，从鸡蛋清中层析出纯度更高的此类蛋白酶抑制剂，并将其命名为“Cystatin”，现在一般称之为“胱抑素”或“半胱氨酸蛋白酶抑制剂”。此后，在包括人在内的多种生物体液、分泌物、组织等中先后分离得到了多种半胱氨酸蛋白酶抑制剂，后将这一类抑制剂统称为“半胱氨酸蛋白酶抑制剂超家族(Cystatins Superfamily)”。该超家族又根据氨基酸序列的相似性及结构中含有二硫键的个数，常规分为三个家族，即家族 1 或 Stefins 家族，家族 2 或 Cystatin 家族，家族 3 或 Kininogen 家族，也可以称为 I 型、II 型及 III 型半胱氨酸蛋白酶抑制剂家族。除此之外，现在发现了以植物半胱氨酸蛋白酶抑制剂所组成的第四个家族[5]。

家族 1 [5]主要包括人 Stefin A、Stefin B，一般存在于细胞质中，但在细胞外液及浓度较高的体液中也有发现，是一种单链蛋白质，其结构缺乏二硫键和糖基，由约 100 个氨基酸残基组成。家族 2 中包括 CystatinC、D、E/M、F、S、SN 和 SA，与家族 1 不同是，家族 2 [5]中的半胱氨酸蛋白酶抑制剂是一种胞外分泌蛋白质，广泛存在于各种分泌物、血液、唾液等体液[6]中，其成员一般由约 120 个氨基酸残基组成单链蛋白质，羧基末端有两个二硫键，在其序列的中心部分均含有一个保守的 Gln-Xaa-Val-Xaa-Gly 片段，称为“cystatin 基序”，除了 E/M [7]、F [8]的二硫键是糖基化蛋白，其余均是非糖基化的。家族 3

[4]即激肽原(Kininogen),是哺乳动物血浆和分泌物中的大型多功能糖蛋白,人体内有 H-Kininogen、L-Kininogen 以及 T-Kininogen,均是一串单链糖蛋白,分别由 N 端重链、激肽段和 C 端轻链组成,含有 9 个二硫键,与激肽酶结合形成缓激肽后发挥舒张血管等作用。

2.2. 半胱氨酸蛋白酶抑制剂在恶性肿瘤发生、发展中的作用

恶性肿瘤的发生在细胞层面多是以细胞周期失控为基础,表现为细胞周期的启动、运行及以终止异常,使得细胞增殖过多,凋亡过少。无限增殖的肿瘤细胞需要新生肿瘤血管为其提供充足养分,此后随着原发肿瘤灶的快速生长,侵袭和转移成为必然结局。细胞凋亡信号系统异常是肿瘤发病过程中的普遍现象,调节细胞周期性凋亡的重要物质是溶酶体组织蛋白酶,而组织蛋白酶中大部分是半胱氨酸蛋白酶,由此对应的半胱氨酸蛋白酶抑制的量也会发生改变。半胱氨酸蛋白酶除了可以调节细胞周期外,在肿瘤侵袭、转移过程中也发挥了重要作用[9] [10],其原因在于细胞外基质的降解是侵袭及转移的关键步骤。

细胞外基质由糖蛋白、胶原、蛋白多糖及氨基葡聚糖等组成,以基底膜或间质结缔组织的形式存在,就像细胞外的“围墙”,在肿瘤细胞的侵袭及转移时起到屏障作用,肿瘤细胞为了躲避这种屏障,产生并释放半胱氨酸蛋白酶等组织蛋白酶参与水解细胞周围的间质组织,直接或间接利于自身的移动[11]。本质上讲,肿瘤的侵袭与转移就是蛋白合成及水解平衡被打破的过程。半胱氨酸蛋白酶抑制剂是参与蛋白水解过程的半胱氨酸蛋白酶的竞争性抑制剂,可协调其生物活性,并作为假底物与半胱氨酸蛋白酶活性部位紧密结合,使靶半胱氨酸蛋白酶不能裂解肽键,从而阻止这种水解作用,限制肿瘤细胞的转移及侵袭[5]。

3. S 型半胱氨酸蛋白酶抑制剂

3.1. S 型半胱氨酸蛋白酶抑制剂的发现

1984 年 Isemura 等人用纤维素柱层析法从人全唾液中分离出一种小分子酸性蛋白,将其命名为“SAP-1”(Synapse associated protein-1),并使用计算机分析得出 SAP-1 和半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 之间存在 54%的氨基酸序列同源性[12]。除此之外,实验中还发现 SAP-1 对木瓜蛋白酶和无花果蛋白酶有较强的抑制作用,而当 SAP-1 被还原和羧甲基化后,对木瓜蛋白酶的抑制活性则完全丧失。通过与半胱氨酸蛋白酶抑制剂 C 氨基酸序列及其生物活性对比,推断出 SAP-1 也是一种半胱氨酸蛋白酶抑制剂,并正式将其命名为半胱氨酸蛋白酶抑制剂 S (Cystatin S)。随后 Isemura、Saitoh 等又先后从人全唾液中分离出半胱氨酸蛋白酶抑制剂 SN (Cystatin SN) [13]、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 SA (Cystatin SA) [14],通过氨基酸测序对比发现以上三种蛋白酶抑制剂的序列相似性约为 90%,并将以上三种抑制剂统称为“S 型半胱氨酸蛋白酶抑制剂(S-type Cystatins)”,又称为“唾液型半胱氨酸蛋白酶抑制剂”。

为了进一步了解 S-type Cystatins, Saitoh E 等[15]从含有人类基因组 DNA HindIII 核酸内切酶位点的噬菌体 λ 文库中分离到了三个编码基因,并使用 cDNA 探针进行基因鉴定,显示其中两个基因分别编码 Cystatin SN 及 Cystatin SA,将其命名为 CST1 (Cystatin 1)和 CST2 (Cystatin 2),而剩余的一个则是假基因。此后又发现了编码 Cystatin S 的基因是 CST4。CST1、CST2 以及 CST4 (Cystatin 4)属于一个基因家族,均聚集在人 20p11.2 的 300 kb 区域内。

3.2. S 型半胱氨酸蛋白酶抑制剂基因在组织中的表达

3.2.1. S 型半胱氨酸蛋白酶抑制剂基因在正常组织中的表达

S 型半胱氨酸蛋白酶抑制剂属于胞外分泌蛋白,广泛存在于人体的各种体液中,在唾液中的含量最高。通过对其编码基因表达部位的确定,可以更好的研究此类蛋白酶抑制剂在人体健康或疾病状态下的

生物学作用。1991年 Bobek 等[16]通过 Northern blotting 分析确定了 CST4 在人颌下腺及腮腺浆液性腺泡中均有表达,在腮腺中的表达水平较低。随后 Dickinson 等[17]先后通过基因特异性核糖核酸酶保护实验(RPA)发现:CST1、CST2、CST4 在颌下腺及腮腺中均有相当水平的表达,CST1、CST4 在泪腺、胆囊及精囊的上皮中有不同水平的表达。特殊的是仅在气管腺体中发现了 CST1,而同时也只在前列腺中发现了 CST4。以上研究虽然已经确定了相关基因在部分人体组织中有表达,且这些基因存在着表达特异性,但 S 型半胱氨酸蛋白酶抑制剂基因的表达部位仍未被完全发现。

3.2.2. S 型半胱氨酸蛋白酶抑制剂在胃肠道肿瘤组织中的表达

现阶段已经有许多蛋白酶相关研究证实半胱氨酸蛋白酶抑制剂参与肿瘤的发生、炎症反应等,所以研究其编码基因在恶性肿瘤组织中的具体表达情况,对疾病的诊断、治疗以及预后判断十分重要。

Choi 等[18]通过逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)、免疫荧光等试验方法证实了相对于正常胃粘膜组织,胃癌组织中 CST1 的表达明显上调,又通过质粒转染试验观察到上调 CST1 表达可以促进胃癌细胞增殖。除此之外,通过比较不同病理分期的胃癌组织中 CST1 的水平,发现 CST1 的表达程度与胃癌 TNM 分期呈正相关。同年, Yoneda 等[19]用 ELISA 法分别检测结直肠癌患者和健康者血清 Cystatin SN 的含量,实验结果提示 Cystatin SN 在结直肠癌患者血清中表达明显高于对照组。同时通过 Western blot 分析试验组的尿液样本,结果显示:除了 Cystatin SN 外未检测出其他结直肠癌尿液标志物,且结直肠癌患者尿液中 Cystatin SN 量较健康者增加。为了更进一步研究 CST1 表达情况与结直肠癌的关系, Kim 等[20]通过质粒转染试验观察到随着 CST1 的表达上调,癌细胞增殖和侵袭性均增加,将该种细胞系模型移植至实验小鼠体内后,表现出肿瘤生长和转移速度的增加。以上的相关研究均说明了 CST1 的高表达与胃、结直肠肿瘤发生相关,且可以促进胃癌及结直肠癌细胞的增殖、侵袭和转移。

关于 CST2 与胃癌的关系, Zhang 等[21]基于 Wang 等[22]的胃癌基因图谱数据库的研究,重新选定并对比了 375 例胃癌组织标本和 32 例正常胃粘膜标本的肿瘤基因组图谱(TCGA),显示 CST2 在胃癌组织中的表达水平明显高于正常组织,并且通过 Kaplan-Meier 曲线分析得出 CST2 高表达的胃癌患者的总体生存率、进展生存率均低于对照组。也通过质粒转染试验下调胃癌细胞中 CST2 表达,发现低表达 CST2 导致胃癌细胞模型的活性、侵袭和迁移均下降,反之肿瘤细胞的特性均增加。此外,还通过检测沉默或者过表达 CST2 后细胞周期蛋白 D1、E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白、波形蛋白、TGF- β 1 和 Smad4 的变化,发现 CST2 的过表达是通过激活 EMT/TGF- β 1 信号通路从而增强胃癌细胞的增殖、侵袭和迁移能力。以上实验均不仅说明 CST2 与胃癌的发生、侵袭以及转移相关,还探讨了 CST2 上游位点,这或许可以成为新的肿瘤治疗的切入点。

作为 S 型半胱氨酸蛋白酶抑制剂的一员 Cystatin S (CST4),在近期的研究中也发现它与胃肠道肿瘤的发生相关。Wang [23]和 Cui [24]的研究中已经发现胃癌组织中 CST4 的均显著上调,但未说明 CST4 与胃癌发生、发展的具体关系。2017 年 Zhang 等[25]人在 Oncomine 数据库查询到已经公开的胃癌微阵列数据,并绘制了不同水平 CST4 的胃癌患者的 Kaplan-Meier 曲线,发现胃癌组织中 CST4 的表达水平与患者的总体预后(OS)和无进展生存期(PFS)呈负相关。在本次实验中应用实时聚合酶链式反应(qPCR)分析得出:实验组标本的 CST4 的表达确实明显高于正常胃黏膜组织,与数据库中的结果一致。为进一步探讨 CST4 在胃癌细胞中的作用,通过转染靶向 CST4-shRNA 下调胃癌细胞系中 CST4 表达,发现无论是常规培养还是软琼脂培养基,其集落形成能力均被显著抑制,反之上调 CST4 表达水平后,胃癌细胞的集落形成能力增强。在肿瘤异种移植模型中,将过表达 CST4 的细胞系移植入小鼠,肿瘤的生长速度及体积大小明显快于低表达组。同样的,将不同表达程度的 CST4 胃癌细胞系同时完成迁徙试验(Transwell)和小鼠体内胃癌细胞肺转移模型实验,得出的结果是:CST4 的表达程度与胃癌细胞的转移能

力呈正相关。以上结果说明无论是体内还是体外, CST4 均促进胃癌细胞的增殖、转移。同时, 还发现了 CST4 是通过上游的 ELFN2 信号通路促进胃癌细胞的增殖、侵袭以及转移。

通过以上一系列的试验, 可以得出 CST1、2、4 均在胃癌和(或)结直肠癌组织中表达增加, 且其表达水平的高低与肿瘤细胞的增殖、侵袭及以转移能力呈正相关。在已经发表的相关研究中, S 型半胱氨酸蛋白酶抑制剂仅在唾液、颌下腺、腮腺、胆囊等组织中被发现, 遂其作为肿瘤标志物的特异性尚可, 若想其成为临床肿瘤诊断标志物, 除了特异性, 还需具有易于检测且准确的方法。因此, Dou 等[26]利用 CST4 在胃癌组织中过表达这一特性, 制备了抗 CST4 的单克隆抗体, 建立了检测人血清 CST4 的酶联免疫吸附(ELISA)分析系统, 该系统具有较高的特异性和敏感性。2021 年吴明兰等[27]收集了胃癌及结直肠癌患者术前血清标本, 同时收集了良性胃肠道病变患者、健康者以及干扰血清样本, 通过 ELISA 分析测定各组血清 CST4 水平, 得出胃癌和结直肠癌患者血清 CST4 浓度中位数均明显高于胃良性疾病组, IV 期的胃癌和结直肠癌患者的 CST4 浓度中位数显著高于 I 至 III 期患者。胃癌患者 CST4 的受试者工作特征曲线(ROC)下面积(AUC)高于 CEA、CA199、CA125; 而结直肠癌患者 CST4 的 AUC 为 0.67, 在联合检测的四种分子标志物种排名第二, 由此得出 CST4 对胃肠癌尤其是胃癌的诊断具有较高的参考价值, 可推荐作为胃肠癌筛查的肿瘤标志物。

4. 总结与展望

现在胃肠道肿瘤的治疗方法日新月异, 但其预后与疾病的诊断时期关系密切, 本篇文章中所提及的 S 型半胱氨酸蛋白酶抑制剂在胃癌及结肠癌中均较正常组织明显表达上调, 且与肿瘤的分期及预后相关, 因其分子量小且出现在血液或者尿液中, 使其可能成为大规模胃肠道肿瘤筛查和术后患者预后判断的预测分子标志物。在诊断上, 现在已经建立了 ELISA 法用以检测血清 CST4, 虽然已有数据表明在胃癌及结直肠癌的检测中敏感性较高, 但仍无法作为疾病的单一诊断指标, 仍需联合其他传统肿瘤标志物做出更加准确的判断。除此之外, 或许因小肠肿瘤发病率相对较低且检查方法特殊, 小肠肿瘤与半胱氨酸蛋白酶抑制剂相关研究的数据较少, 此处可作为新的研究方向。

参考文献

- [1] Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A. and Jemal, A. (2018) Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **68**, 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- [2] 袁思依, 李景南. 分子标志物在结直肠癌筛查中的应用[J]. 中国实用内科杂志, 2018, 38(9): 788-791.
- [3] Fossum, K. and Whitaker, J.R. (1968) Ficin and Papain Inhibitor from Chicken Egg White. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **125**, 367-375. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(68\)90672-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(68)90672-3)
- [4] Anastasi, A., Brown, M.A., Kembhavi, A.A., Nicklin, M.J.H., Sayers, C.A., Sunter, D.C., *et al.* (1983) Cystatin, a Protein Inhibitor of Cysteine Proteinases. Improved Purification from Egg White, Characterization, and Detection in Chicken Serum. *Biochemical Journal*, **211**, 129-138. <https://doi.org/10.1042/bj2110129>
- [5] Shamsi, A. and Bano, B. (2017) Journey of Cystatins from Being Merethiol Protease Inhibitors to at Heart of Many Pathological Conditions. *International Journal of Biological Macromolecules*, **102**, 674-693. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.071>
- [6] Abrahamson, M., Barrett, A.J., Salvesen, G. and Grubb, A. (1986) Isolation of Six Cysteine Proteinase Inhibitors from Human Urine. Their Physicochemical and Enzyme Kinetic Properties and Concentrations in Biological Fluids. *Journal of Biological Chemistry*, **261**, 11282-11289. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)67380-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)67380-6)
- [7] Ni, J., Abrahamson, M., Zhang, M., Fernandez, M.A., Grubb, A., Su, J., *et al.* (1997) Cystatin E Is a Novel Human Cysteine Proteinase Inhibitor with Structural Resemblance to Family 2 Cystatins. *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 10853-10858. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.16.10853>
- [8] Ni, J., Fernandez, M.A., Danielsson, L., Chillakuru, R.A., Zhang, J., Grubb, A., *et al.* (1998) Cystatin F Is a Glycosylated Human Low Molecular Weight Cysteine Proteinase Inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, **273**, 24797-24804.

- <https://doi.org/10.1074/jbc.273.38.24797>
- [9] Hook, V., Funkelstein, L., Wegrzyn, J., Bark, S., Kindy, M. and Hook, G. (2012) Cysteine Cathepsins in the Secretory Vesicle Produce Active Peptides: Cathepsin L Generates Peptide Neurotransmitters and Cathepsin B Produces Beta-Amyloid of Alzheimer's Disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)—Proteins and Proteomics*, **1824**, 89-104. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.08.015>
- [10] Cheng, X.W., Huang, Z., Kuzuya, M., Okumura, K. and Murohara, T. (2011) Cysteine Protease Cathepsins in Atherosclerosis-Based Vascular Disease and Its Complications. *Hypertension*, **58**, 978-986. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.180935>
- [11] Harlozinska, A. (2005) Progress in Molecular Mechanisms of Tumor Metastasis and Angiogenesis. *Anticancer Research*, **25**, 3327-3333.
- [12] Satoko, I., Eiichi, S. and Kazuo, S. (1984) Isolation and Amino Acid Sequence of SAP-1, an Acidic Protein of Human Whole Saliva, and Sequence Homology with Human Gamma-Trace. *Journal of Biochemistry*, **96**, 489-498. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a134861>
- [13] Isemura, S., Saitoh, E. and Sanada, K. (1986) Characterization of a New Cysteine Proteinase Inhibitor of Human Saliva, Cystatin SN, Which Is Immunologically Related to Cystatin S. *FEBS Letters*, **198**, 14514-14519. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(86\)81201-7](https://doi.org/10.1016/0014-5793(86)81201-7)
- [14] Isemura, S., Saitoh, E. and Sanada, K. (1987) Characterization and Amino Acid Sequence of a New Acidic Cysteine Proteinase Inhibitor (Cystatin SA) Structurally Closely Related to Cystatin S, from Human Whole Saliva. *Journal of Biochemistry*, **102**, 693-704. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122107>
- [15] Saitoh, E., Kim, H.S., Smithies, O. and Maeda, N. (1987) Human Cysteine-Proteinase Inhibitors: Nucleotide Sequence Analysis of Three Members of the Cystatin Gene Family. *Gene*, **61**, 329-338. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(87\)90196-X](https://doi.org/10.1016/0378-1119(87)90196-X)
- [16] Bobek, L.A., Aguirre, A. and Levine, M.J. (1991) Human Salivary Cystatin S. Cloning, Sequence Analysis, Hybridization *in Situ* and Immunocytochemistry. *Biochemical Journal*, **278**, 627-635. <https://doi.org/10.1042/bj2780627>
- [17] Dickinson, D.P., Thiesse, M. and Hicks, M.J. (2002) Expression of Type 2 Cystatin Genes CST1-CST5 in Adult Human Tissues and the Developing Submandibular Gland. *DNA and Cell Biology*, **21**, 47-65. <https://doi.org/10.1089/10445490252810311>
- [18] Choi, E.H., Kim, J.T., Kim, J.H., Kim, S.Y., Song, E.Y., Kim, J.W., *et al.* (2009) Upregulation of the Cysteine Protease Inhibitor, Cystatin SN, Contributes to Cell Proliferation and Cathepsin Inhibition in Gastric Cancer. *Clinica Chimica Acta*, **406**, 45-51. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2009.05.008>
- [19] Yoneda, K., Iida, H., Endo, H., Hosono, K., Akiyama, T., Takahashi, H., *et al.* (2009) Identification of Cystatin SN as a Novel Tumor Marker for Colorectal Cancer. *International Journal of Oncology*, **35**, 33-40. <https://doi.org/10.3892/ijo.00000310>
- [20] Kim, J.T., Lee, S.J., Kang, M.A., Park, J.E., Kim, B.Y., Yoon, D.Y., *et al.* (2013) Cystatin SN Neutralizes the Inhibitory Effect of Cystatin C on Cathepsin B Activity. *Cell Death & Disease*, **4**, Article No. e974. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.485>
- [21] Zhang, W.P., Wang, Y., Tan, D. and Xing, C.G. (2020) Cystatin 2 Leads to a Worse Prognosis in Patients with Gastric Cancer. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, **34**, 2059-2067.
- [22] Wang, Z., Chen, G., Wang, Q., Lu, W. and Xu, M. (2017) Identification and Validation of a Prognostic 9-Genes Expression Signature for Gastric Cancer. *Oncotarget*, **8**, 73826-73836. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17764>
- [23] Wang, Q., Wen Y G., Li, D.P., Xia, J., Zhou, C.Z., Yan, D.W., *et al.* (2012) Upregulated INHBA Expression Is Associated with Poor Survival in Gastric Cancer. *Medical Oncology*, **29**, 77-83.
- [24] Cui, J., Chen, Y., Chou W C., Sun, L., Chen, L., Suo, J., *et al.* (2011) An Integrated Transcriptomic and Computational Analysis for Biomarker Identification in Gastric Cancer. *Nucleic Acids Research*, **39**, 1197-1207. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq960>
- [25] Yi, Q.Z., Jing, J.Z., Hong, J.S. and Li, D.W. (2017) Overexpression of CST4 Promotes Gastric Cancer Aggressiveness by Activating the ELFN2 Signaling Pathway. *American Journal of Cancer Research*, **7**, 2290-2304.
- [26] Dou, Y.L., Lyu, Y.L., Zhou, X.J., He, L.F., Liu, L.H., Li, P.F., *et al.* (2018) Antibody-Sandwich Elisa Analysis of a Novel Blood Biomarker of CST4 in Gastrointestinal Cancers. *Oncotargets and Therapy*, **11**, 1743-1756. <https://doi.org/10.2147/OTT.S149204>
- [27] 吴明兰, 林美花, 翟优, 吕朵, 张乔, 吴国兰, 等. 半胱氨酸蛋白酶抑制剂 S 在胃癌中的诊断价值研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2021, 37(5): 503-506.