Identificazione di potenziali biomarcatori sierici di adenocarcinoma pancreatico

Andrea Padoan[1], Paola Fogar[2], Eliana Greco[2], Elisa Fadi[1], Dania Bozzato[1], Stefania Moz[1], Filippo Navaglia[2], Carlo Federico Zambon[2], Roberta Seraglia[3], Michela Pelloso[1], Elisa Rossi[1], Daniela Basso[2], Mario Plebani[1,2]
[1]Dipartimento di Scienze Medico-Diagnostiche e Terapie Speciali, Università degli Studi, Padova
[2]Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera di Padova, Padova
[3]Centro Nazionale delle Ricerche, Istituto di Scienze e Tecnologie Molecolari (ISTM), Padova

Questo lavoro è stato in parte presentato al 42° Congresso Nazionale SIBioC, 5-8 ottobre 2010, Roma, sotto forma di poster (Biochim Clin 2010;34:498), ricevendo, nella persona del suo primo autore (A. Padoan), il premio SIBioC destinato ai 4 migliori poster presentati.

ABSTRACT

Identification of potential serum biomarkers of pancreatic cancer. The aim of this study was to verify whether discontinuous SDS-PAGE, performed in the conditions that allowed the isolation of S100A8 aminoterminal peptide from pancreatic cancer (PC) tissue, can identify potential serum markers of PC and PC induced diabetes mellitus (DM). We collected sera from 42 PC patients (17 with and 25 without DM) and from 11 healthy controls (C). In the low MW range (1 to 15 kDa), nine protein bands were identified and numbered 1 to 9 from heaviest to lightest. Only band number 2 (~14.2 kDa) was correlated with PC diagnosis, being present in 10 out of 11 C and absent in 37 out of 42 PC cases ($P < 0.001$). Bands 4 and 9 (MW 10 and 1 kDa, respectively) correlated with each other ($P < 0.05$). In PC patients, the absence of both bands correlated with the presence of DM ($P < 0.01$ for band 4 and $P < 0.05$ for band 9) and was significantly associated with higher fasting plasma glucose concentrations ($P < 0.05$ for band 4 and $P < 0.01$ for band 9). The absence of band 9 was also significantly associated with HbA_{1c} ($P < 0.05$) and with glucose/C-peptide ratio ($P < 0.05$). To characterize the protein inversely correlated with PC diagnosis, we performed a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight/mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) analysis of the tryptic in-gel digestion of band 2. The identified peaks were analysed by Mascot peptide mass fingerprint and showed a high homology with human hemoglobin subunit β (score 76, $P < 0.05$). SDS-PAGE analysis of the low MW serum proteins allowed the detection of peptides correlated with PC derived DM and the identification of free β-globin as a potential PC serum marker.

INTRODUZIONE

Il carcinoma del pancreas è uno tra i più letali tumori che affliggono i paesi industrializzati, con un tasso di sopravvivenza a 5 anni dalla diagnosi di circa il 5% (1). La maggior parte dei pazienti muore entro il primo anno dalla diagnosi della malattia e la quasi totalità dei pazienti sviluppa metastasi. Tra i motivi che rendono la prognosi del carcinoma del pancreas così infausta vi sono l'elevata capacità proliferativa e invasiva di questo tumore, il ritardo diagnostico legato alla paucità della sintomatologia e la mancanza di biomarcatori sensibili e specifici. Considerando i numerosi marcatori sierologici studiati negli ultimi 30 anni, il CA 19-9 rappresenta l'unica determinazione sierica utilizzata, a fianco di indagini strumentali, per confermare la diagnosi di adenocarcinoma pancreatico, anche se le linee guida europee ("European Society for Medical Oncology") ne escludono l'utilizzo per lo screening. Questa raccomandazione deriva in parte dal valore clinico del biomarcatore, che diminuisce quando la neoplasia pancreatica è in stadio iniziale, ma è conseguenza soprattutto dalla bassa incidenza di questo tumore nella popolazione generale (in Italia pari a 18,2 individui ogni 100.000 abitanti). A differenza di altre neoplasie, come il carcinoma del colon-retto o della mammella, per il carcinoma del pancreas non sono definite delle popolazioni di soggetti a rischio elevato.

Lo scopo dello screening di una patologia a così bassa incidenza come il carcinoma pancreatico sporadico è quindi di selezionare un gruppo di soggetti ad alto rischio a partire da una popolazione asintomatica, sui quali poi confermare o escludere la diagnosi mediante indagini strumentali più specifiche. Alcuni Autori, tra cui Pannala et al. (2), hanno proposto di utilizzare nei soggetti con età superiore a 50 anni il diabete di recente insorgenza come primo filtro per lo screening della neoplasia pancreatica. E' infatti noto che

Corrispondenza a: Mario Plebani, Dipartimento di Medicina di Laboratorio, Azienda Ospedaliera di Padova, Via Giustiniani 2, 35128 Padova. Tel. 0498212792, Fax 049663240, E-mail mario.plebani@unipd.it

Ricevuto: 24.01.2011 Revisionato: 23.03.2011 Accettato: 06.04.2011

i pazienti con questo tumore presentano spesso un'elevata incidenza del diabete mellito franco o di ridotta tolleranza al glucosio (fino al 75-90% dei casi) alla diagnosi. Tuttavia, il diabete associato a carcinoma del pancreas è, nella maggior parte dei casi, di recente insorgenza (<2 anni) (2, 3) e migliora in seguito alla resezione chirurgica della neoplasia (4, 5). Queste evidenze rappresentano un esempio di inversione di casualità e potrebbero indicare il diabete di recente insorgenza come una conseguenza della neoplasia pancreatica e non, viceversa, un fattore eziologico di questa neoplasia. Tuttavia, se la determinazione ad intervalli regolari della glicemia potrebbe permettere di identificare la comparsa repentina di un alterato metabolismo glucidico, rimane aperta la ricerca di un biomarcatore in grado di correlare il diabete mellito di recente insorgenza con il carcinoma del pancreas.

Nel 2006, il nostro gruppo ha identificato un peptide di 14 amminoacidi, isolato da tessuto neoplastico di pazienti con cancro del pancreas e diabete mellito associato, la cui sequenza corrisponde al frammento ammino-terminale della proteina legante il calcio S100A8 (NT-S100A8) e ne ha documentato *in vitro* la sua azione diabetogena (6). S100A8 è stata descritta come una proteina immunogenica, espressa prevalentemente dai neutrofili, monociti e macrofagi insieme al suo partner S100A9, con il quale forma il complesso conosciuto come calprotectina. Studi in letteratura supportano l'ipotesi che S100A8 giochi un ruolo importante nel cancro (7). Un lavoro di Sheikh et al. (8) ha dimostrato che questa proteina è sovraespressa nel cancro del pancreas e viene prodotta da parte di monociti o macrofagi non differenziati infiltranti lo stroma tumorale e da leucociti neutrofili presenti a livello vascolare attorno alla neoplasia. Ang et al. (9) hanno osservato che queste due proteine erano in grado di aumentare l'invasività delle linee cellulari SW837 e SW480 di carcinoma del retto e PANC-1 di cancro del pancreas. Inoltre, uno studio di Greenlee et al. (10) ha dimostrato che, dopo taglio proteolitico di S100A8 da parte della metalloproteinasi di matrice 2 (MMP2), i frammenti di proteolisi mantengono la loro attività chemiotattica.

In questo lavoro si è voluto verificare se l'applicazione della metodica di elettroforesi monodimensionale su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE), che ci ha permesso di isolare NT-S100A8 da tessuto neoplastico pancreatico, era utile per identificare biomarcatori sierici di carcinoma pancreatico o di diabete mellito associato a carcinoma pancreatico.

MATERIALI E METODI

Pazienti

Sono stati studiati 42 pazienti affetti da adenocarcinoma del pancreas (22 maschi e 20 femmine) con età compresa tra 52 e 83 anni, reclutati nella Clinica Chirugica IV dell'Università degli Studi di Padova. In tali pazienti lo stadio della neoplasia era il seguente: 3 casi IB (T2 N0 M0), 3 casi IIA (T3 N0 M0), 15 casi IIB (T1-3 N1 M0), 6 casi III (qualsiasi N M0, invasione vascolare) e 15 casi IV (qualsiasi T, qualsiasi N, M1). I casi sono stati selezionati retrospettivamente in modo da ottenere due gruppi rappresentativi di presenza (17 casi, 1 di stadio IB, 9 di stadio IIB, 2 di stadio III e 5 di stadio IV) o assenza di diabete mellito (25 casi, 2 di stadio IB, 3 di stadio IIA, 6 di stadio IIB, 4 di stadio III e 10 di stadio IV). Il dato sulla sopravvivenza dopo intervento chirurgico era disponibile per 28 su 42 pazienti. Nello studio sono stati anche inclusi 11 controlli non diabetici (5 maschi e 6 femmine) con età compresa tra 41 e 68 anni. Durante l'effettuazione del lavoro è stata rispettata e applicata la dichiarazione di Helsinki del 1975, emendata nel 1996, e si è ottenuto uno specifico consenso informato da ciascuno dei soggetti

Metodi

I campioni di sangue periferico sono stati raccolti al momento della diagnosi, a digiuno, mediante prelievo venoso in provette con gel separatore. Queste ultime sono state centrifugate a 4000 rpm per 5 min; il siero ottenuto è stato congelato a -80 °C fino al momento della analisi SDS-PAGE. In tutti i campioni è stata determinata la glicemia mediante metodo enzimatico su piattaforma Modular (Roche Diagnostics); le concentrazioni sieriche di C-peptide (Immulite 2000, Medical Systems) e i risultati di HbA_{1c} (HPLC HA8160, Menarini) erano recuperati dalle cartelle cliniche per un sottogruppo di 18 pazienti.

Ciascun campione di siero, diluito 1:10 in terreno di coltura cellulare "Roswell Park Memorial Institute" (RPMI) (Gibco/BRL) è stato denaturato in "Laemmli's buffer" [60 mM Tris–HCl (pH 6,8), 20% glicerolo, 10% β-mercaptoetanolo, 4,6% sodio dodecilsolfato (SDS) e 0,003% di blu di bromofenolo] e separato mediante SDS-PAGE con gradiente discontinuo al 16,5% di SDS, ottimale per l'analisi di molecole di basso PM. Oltre alla serie di campioni, in ogni corsa elettroforetica è stato aggiunto "Ultra low range MW marker" (Sigma-Aldrich). Per l'analisi SDS-PAGE di NT-S100A8 fluorescente [5(6)-carbossi-fluorescina all'estremo ammino-terminale, Primm S.r.l.] è stata utilizzata la procedura sopra descritta, caricando 50 µL di NT-S100A8 500 nM diluito in acqua o in un pool di sieri preventivamente diluito 1:10 in RPMI. La corsa elettroforetica è stata eseguita alla temperatura controllata di 10 °C (Cryostats Bath, MPM Instruments S.r.l.) per 16 ore a 80 V. In seguito, le proteine sono state fissate al gel in una soluzione al 50% metanolo e 10% acido acetico e colorate con 0,025% G Brilliant Blue (Sigma Chemical Co.) in acido acetico al 10%. La decolorazione è stata ottenuta ponendo il gel in soluzione al 10% acido acetico per 48 ore. La bande di interesse nel gel sono state tagliate e processate secondo protocollo suggerito da Bruker Daltonik, GmbH. Brevemente, a seguito di 2 lavaggi con una soluzione 50 mM di NH_4HCO_3/acetonitrile (v/v) per 15 min e deidratazione con acetonitrile, i corrispondenti frammenti di gel sono stati ridotti in una soluzione di 10 mM

ditiotreitolo in 25 mM NH_4HCO_3 (v/v) e alchilati per 30 min con una soluzione 55 mM di iodoacetamide in 25 mM NH_4HCO_3. A seguito di un ulteriore lavaggio in 50 mM di NH_4HCO_3 è stata eseguita la digestione enzimatica con tripsina 5 ng/µL in 25 mM NH_4HCO_3 a 37 °C "overnight" e il composto ottenuto è stato sonicato per 10 min. Il campione è stato poi analizzato mediante "matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight/mass spectrometry" (MALDI-TOF/MS) Ultraflex II (Bruker Daltonik, GmbH) utilizzato in modalità "reflectron positive". La ionizzazione è stata eseguita mediante laser UV (λ = 337 nm), con le seguenti condizioni sperimentali: "ion source" 1 (IS1) = 25 kV; "ion source" 2 (IS2) = 22,6 kV; "delay time" = 70 ns. Come matrice è stata usato l'acido α-ciano-4-idrossicinnamico (soluzione satura in H_2O/acetonitrile/0,1% acido trifluoroacetico). Per l'analisi, 5 µL di matrice sono stati miscelati con 5 µL di campione e 1 µL di questa soluzione è stata poi depositata nella piastra "stainless steel" e lasciata asciugare all'aria. Gli spettri ottenuti sono stati valutati mediante il "software" FlexAnalysis (Bruker Daltonik, GmbH) e i peptidi corrispondenti analizzati mediante il "peptide mass fingerprint" del sistema Mascot (Matrix Science), considerando positivi gli "score" con P <0,05.

L'analisi statistica è stata eseguita tramite il "software" SPSS per windows (versione 9.0) utilizzando il test di Mann-Whitney per il confronto tra gruppi, il test del χ^2 per il confronto di proporzioni, il metodo di Kaplan-Meier e il "log-rank" test per il calcolo della sopravvivenza e per il confronto dei due gruppi di stratificazione.

RISULTATI

Dall'analisi mediante SDS-PAGE del profilo a basso PM dei sieri è stato possibile distinguere 9 bande, il cui PM approssimativo risultava compreso tra 1 e 16 kDa (Figura 1). Tre di queste bande presentavano una diversa distribuzione tra i gruppi studiati. Solo la banda 2, del PM approssimativo di 14,2 kDa, era inversamente correlata alla presenza di cancro del pancreas, in quanto presente in 10 su 11 soggetti di controllo (91%) e assente in 37 su 42 pazienti neoplastici (88%) (χ^2 = 26,8; P <0,001). Le bande 4 e 9 erano tra loro correlate sia considerando casi e controlli complessivamente (χ^2 = 11,54, P <0,001), sia considerando i pazienti affetti da carcinoma pancreatico singolarmente (χ^2 = 3,97, P=0,056). La banda 4 era ben identificabile in 6 soggetti di controllo e appena rilevabile nei rimanenti 5 casi; la banda 9 era identificabile in 10 su 11 soggetti di controllo. Nei pazienti affetti da carcinoma pancreatico entrambe le bande 4 e 9 risultavano inversamente correlate con la presenza di diabete mellito, in quanto significativamente meno frequenti nei pazienti con diabete rispetto a quelli senza diabete (χ^2 = 8,6, P <0,01 per la banda 4 e χ^2 = 6,6, P <0,05 per la banda 9). L'assenza completa della banda 4 era associata con concentrazioni sieriche più elevate di glucosio, mentre l'assenza della banda 9 era associata con concentrazioni più elevate di glucosio e HbA_{1c} e rapporto C-peptide/glucosio più elevato (Tabella 1).

Delle bande identificate nessuna corrispondeva per PM a NT-S100A8. La corsa elettroforetica di NT-S100A8 fluorescente mediante SDS-PAGE permetteva di evidenziare che quando la molecola era diluita nel pool di sieri, ma non in acqua, era presente un trascinamento

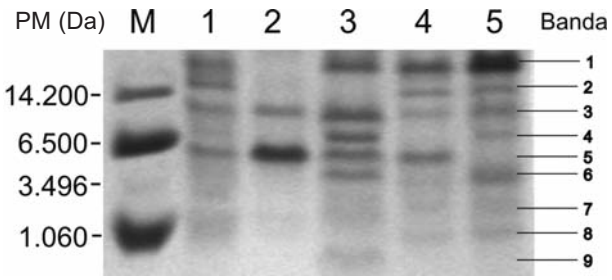


Figura 1
Immagine rappresentativa di cinque sieri di pazienti con adenocarcinoma del pancreas ottenuta mediante l'analisi SDS-PAGE.
M, "Ultra low range MW marker"; 1, adenocarcinoma del pancreas di stadio IV senza diabete associato; 2, adenocarcinoma del pancreas di stadio IV con diabete associato; 3, adenocarcinoma del pancreas di stadio IIB senza diabete associato; 4, adenocarcinoma del pancreas di stadio IIB con diabete associato; 5, adenocarcinoma del pancreas di stadio IV con diabete associato.

Tabella 1
Correlazione tra le bande 4 e 9 identificate mediante metodica SDS-PAGE e gli indici biochimici del metabolismo del glucosio nei pazienti con adenocarcinoma del pancreas studiati.

	Glucosio, mmol/L		HbA_{1c}, %		C peptide, µg/L		Glucosio/C peptide	
	n	Media ± ES	n	Media ± ES	n	Media ± ES	n	Media ± ES
Banda 4 presente	26	6,5 ± 0,4	12	5,3 ± 0,2	12	3,2 ± 0,3	12	1,9 ± 0,2
Banda 4 assente	16	8,3 ± 0,8	6	6,5 ± 0,8	6	3,2 ± 0,6	6	3,8 ± 1,3
		P <0,05		P >0,05		P >0,05		P >0,05
Banda 9 presente	33	6,4 ± 0,3	14	5,2 ± 0,2	14	3,3 ± 0,3	14	1,9 ± 0,1
Banda 9 assente	9	10,1 ± 1,2	4	7,4 ± 0,7	4	3,0 ± 0,7	4	4,8 ± 1,9
		P <0,01		P <0,05		P >0,05		P <0,05

della fluorescenza, probabilmente dovuto al legame aspecifico del peptide con componenti a basso PM (Figura 2).

In un sottogruppo di 28 pazienti con adenocarcinoma pancreatico è stato possibile analizzare la sopravvivenza. Entrambe le bande 4 e 9 non risultavano associate a una differenza significativa della sopravvivenza. La presenza della banda 2 risultava associata a un lieve miglioramento della sopravvivenza (mediana, 18 vs. 16 mesi), anche se tale differenza non raggiungeva la significatività statistica (P = 0,16).

Al fine di caratterizzare le tre bande con diversa distribuzione tra i gruppi studiati, esse erano escisse dal gel e sottoposte ad analisi MALDI-TOF/MS. Mentre la quantità del materiale peptidico ottenuto dalle bande 4 e 9 era troppo scarsa per ottenere un'analisi soddisfacente, il materiale ottenuto dalla banda 2 risultava adeguato non solo per l'analisi MS, ma anche per la successiva digestione triptica. Sulla base delle caratteristiche dello spettro di massa e mediante l'impiego del "software" "peptide mass fingerprint" del Mascot, la banda 2 risultava corrispondere alla β-globina umana (Uniprot ID: P68871-1, http://www.uniprot.org/uniprot/p68871) (score = 76, P <0,05).

DISCUSSIONE

I principali fattori di rischio per l'adenocarcinoma del pancreas sono demografici, ambientali e genetici. Più del 80% degli adenocarcinomi colpiscono soggetti di età compresa tra 60 e 80 anni, rappresentando quindi il dato anagrafico un importante fattore da considerare. Altri fattori di rischio sono stati riconosciuti nel fumo di sigaretta e nel diabete mellito di recente insorgenza (11). Per questa neoplasia, che non presenta sintomi clinici precoci, l'unico biomarcatore sierico utilizzabile è il CA 19-9. Tuttavia, la sua incapacità di identificare lesioni precancerose ne preclude l'utilizzo per lo screening di popolazione.

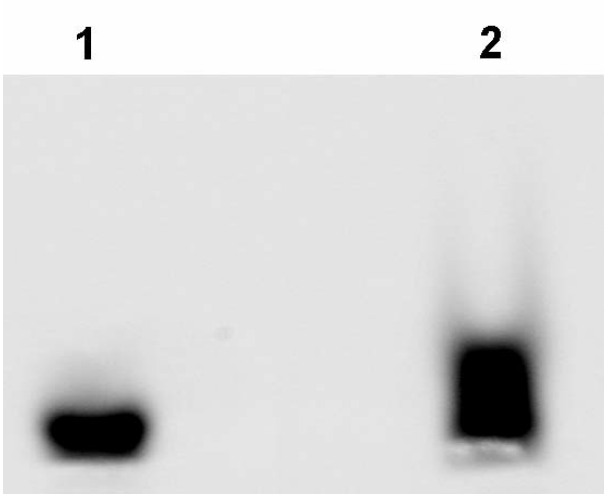


Figura 2
Analisi SDS-PAGE di frammento ammino-terminale della proteina legante il calcio S100A8 (NT-S100A8) resa fluorescente.
1, NT-S100A8 diluita in acqua; 2, NT-S100A8 diluita in siero.

L'analisi del proteoma sierico a basso PM di pazienti con carcinoma del pancreas potrebbe facilitare la scoperta di nuovi biomarcatori. Con la metodica SDS-PAGE utilizzata in questo lavoro, il nostro gruppo ha precedentemente isolato da tessuto tumorale di pazienti affetti da carcinoma del pancreas e diabete associato un peptide di 14 amminoacidi, che corrisponde alla NT-S100A8 (6). Nel presente studio con questa metodica è stato possibile identificare nel siero di pazienti con carcinoma del pancreas 9 bande nell'intervallo di PM compreso tra circa 15 e 1 kDa. Tra queste, la banda 2 di 14,2 kDa è risultata inversamente associata alla presenza del cancro del pancreas: era infatti presente in 10 su 11 soggetti di controllo e assente in 37 su 42 pazienti neoplastici. La caratterizzazione di questi 5 pazienti con la banda 2, tipica dei soggetti di controllo, ha permesso di evidenziare un lieve aumento della sopravvivenza rispetto ai pazienti senza banda 2. La significatività statistica non è stata tuttavia raggiunta, probabilmente per l'esigua numerosità dei campioni analizzati. Non vi erano, invece, differenze nello stadio di malattia, livelli di CA 19-9 o indici biochimici di funzionalità epatica (dati non riportati).

Dall'analisi mediante metodica MALDI-TOF/MS la banda 2 è risultata essere la β-globina umana: non è tuttavia chiara la relazione tra l'assenza nel siero di questa proteina e la presenza di neoplasia pancreatica. Un'ipotesi potrebbe essere che citochine rilasciate dai macrofagi attivati e infiltranti la neoplasia possano alterare l'eritropoiesi. Tuttavia, nella nostra casistica solo la metà dei pazienti studiati presentava un'anemia al momento della diagnosi (dati non riportati). Un'altra ipotesi potrebbe essere che la neoplasia rilasci fattori solubili in grado di inibire a livello midollare la risposta immune antitumorale, alterando al contempo anche l'eritropoiesi. In questa valutazione è stato anche evidenziato che due bande, la 4 e la 9, associate tra loro, erano assenti prevalentemente nei pazienti neoplastici con diabete mellito associato, rispetto a soggetti con carcinoma non diabetici. In particolare, l'importanza dell'eventuale identificazione della natura molecolare di queste bande risiede nella possibile facilitazione dello screening della popolazione asintomatica, laddove si riscontrino delle variazioni improvvise dello stato glicemico nei pazienti con età >50 anni. NT-S100A8 non risultava rilevabile nei sieri nonostante la metodica utilizzata fosse la stessa di quella impiegata per la sua identificazione su tessuto. Questo fatto può essere spiegato ipotizzando che a un'elevata produzione nel microambiente tumorale non corrisponda un'altrettanto elevata concentrazione sierica, per un effetto di emodiluizione. Nel siero, inoltre, NT-S100A8 potrebbe essere presente non tanto nella forma libera, ma complessata con altri peptidi, come suggerisce l'analisi con NT-S100A8 fluorescente.

L'impiego delle metodiche di MS e proteomica nello studio di marcatori precoci per l'adenocarcinoma del

pancreas potrebbe indirizzare la ricerca verso proteine/peptidi o combinazioni ("pattern") di essi utili all'identificazione di lesioni precoci preneoplastiche, con evidenti benefici sia per la diagnosi di pazienti sintomatici che nello screening della popolazione asintomatica. A fianco a questi teorici vantaggi, una difficoltà intrinseca a questo metodo di analisi potrebbe essere invece il legame di queste piccole molecole con proteine sieriche a basso-medio PM. Nel complesso questo approccio sembra molto promettente, ma richiede ulteriori conferme mediante l'utilizzo di casistiche più ampie, che permettano anche la validazione successiva dei dati ottenuti mediante metodiche alternative.

BIBLIOGRAFIA

1. Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics 2010. CA Cancer J Clin 2010;60:277-300.
2. Pannala R, Basu A, Petersen GM, et al. New-onset diabetes: a potential clue to the early diagnosis of pancreatic cancer. Lancet Oncol 2009;10:88-95.
3. Chari ST, Leibson CL, Rabe KG, et al. Pancreatic cancer-associated diabetes mellitus: prevalence and temporal association with diagnosis of cancer. Gastroenterology 2008;134:95-101.
4. Permert J, Ihse I, Jorfeldt L, et al. Improved glucose metabolism after subtotal pancreatectomy for pancreatic cancer. Br J Surg 1993;80:1047-50.
5. Fogar P, Basso D, Panozzo MP, et al. C-peptide pattern in patients with pancreatic cancer. Anticancer Res 1993;13:2577-80.
6. Basso D, Greco E, Fogar P, et al. Pancreatic cancer-derived S-100A8 N-terminal peptide: a diabetes cause? Clin Chim Acta 2006;372:120-8.
7. Hiratsuka S, Watanabe A, Sakurai Y, et al. The S100A8-serum amyloid A3-TLR4 paracrine cascade establishes a pre-metastatic phase, Nat Cell Biol 2010;31:1541-51.
8. Sheikh AA, Vimalachandran D, Thompson CC, et al. The expression of S100A8 in pancreatic cancer-associated monocytes is associated with the Smad4 status of pancreatic cancer cells. Proteomics 2007;7:1929-40.
9. Ang CW, Nedjadi T, Sheikh AA, et al. Smad4 loss is associated with fewer S100A8-positive monocytes in colorectal tumors and attenuated response to S100A8 in colorectal and pancreatic cancer cells. Carcinogenesis 2010;31:1541-51.
10. Greenlee KJ, Corry DB, Engler DA, et al. Proteomic identification of in vivo substrates for matrix metallo proteinases 2 and 9 reveals a mechanism for resolution of inflammation. J Immunol 2006;177:7312-21.
11. Krejs GJ. Pancreatic cancer: epidemiology and risk factors. Dig Dis 2010;28:355-8.