维普资讯 http://www.cqvip.com

局解手术学杂志 2007年第16卷第6期
J Regional Anat & Operative Surg, 2007, Vol. 16, No. 6

肿瘤分子标记物检测的进展

Progress in detection of tumor molecular marker

严丽丽 （第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所消化科，重庆 400042）

［关键词］肿瘤标志物；分子标记物检测；检测方法
［中图分类号］R730.3 ［文献标识码］B ［文章编号］1672-5042(2007)06-0428-02

在肿瘤的发生过程中，血清中某些肿瘤标志物的升高与肿瘤密切相关。因此，检测肿瘤标记物在对肿瘤的筛选、诊断和判断预后中扮演着重要的角色。肿瘤标志物的研究进行了许多年，并且有大量的文献报道，但是真正能够用于临床的肿瘤标志物的数量还相当有限[1]。目前已经确定与肿瘤相关的肿瘤标志物有癌胚抗原（CEA）、糖抗原（CA19-9）、癌抗原（CA125）、甲胎蛋白（AFP）、前列腺特异抗原（PSA）、CA15-3、人绒毛膜促性腺激素（hCG）等，被分别用于对结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢上皮肿瘤、干细胞癌等的诊断[2-3]。同时肿瘤标志物检测作为一种无创的检查方法，也适用于对肿瘤进行疗效监控、活动性和并发症评估以及随访。因此，血清中肿瘤标志物的检测是临床检测中非常重要的检查方法[4]。

通常用于量化检测肿瘤标记物的方法是免疫测定法，其在临床实验室检查上已经得以了广泛的运用。但是，传统的免疫测定法存在着许多的缺限，比如耗时较长，精确度较低及实现自动化较为困难[4]。为了提高免疫测定法检测的准确率，从早期单个的肿瘤标志物测试发展到了后来的肿瘤标志物联合测定。这样虽然在一定程度上提高了肿瘤标志物测定的精确度，但是并没有从根本上改善免疫测定法的不足。随着一些新技术的发展和在肿瘤标志物测定方面的运用，肿瘤标志物测定必将在肿瘤的防治中发挥更加重要的作用。

1 发光免疫测定

发光免疫测定（Chemiluminescent Immunoassay，CLIA）是Halman于1977年建立。其基于放射免疫分析的基本原理，将发光物质或酶标记在抗原或抗体上，免疫反应结束后，加入氧化剂或酶底物而发光，通过测量发射光的强度，根据标准趋向测定待测物的浓度。文献报道，从酶免疫测定、荧光免疫测定发展到发光免疫测定，使最低检出值的灵敏度提高了10 000倍[5]。Wesseling S等用CLIA仪检测总前列腺特异性抗原（tPSA）和游离前列腺特异性抗原（fPDA），认为其可区分前列腺癌和良性前列腺增生[6]。Deng YF等也用电化学发光免疫分析检测了人头部和颈部鳞细胞癌的CYFRE21-1，并探讨了其临床意义，发现其不但对诊断有意义，而且对患者的病情追踪有意义[7]。CLIA具有两种类型：间接式（有标记）和直接式（无标记）。前者一般是用酶或荧光标记物来提供检测信号，但因为受检测的光水平较低，所以需要复杂的监测仪器；后者目前使用较为广泛，包括了衰减式全内反射、椭圆率测量法、表面等离子体共振、单模双电波导、光纤波导、干扰仪和光栅藕合器等多种形式。虽然CLIA可能遇到诸如外界光线的干扰、迟钝的反应时间和试剂相遗漏等问题，但其能对抗原－抗体的相互作用进行实时检测，仪器价格低廉，可实现自动化，使用简便、安全、无放射性污染，成为了标记免疫分析的一个重要方向。目前在国外CLIA已经被广泛的用于研究肿瘤标志物，并逐步被运用于临床。其以高的灵敏度和简便的仪器操作而在肿瘤标志物的检测中展现出了巨大的优势。

2 免疫传感器

临床使用的肿瘤标志物的检测方法虽然具有一定的灵敏度、准确度及特异性，但其在环保、操作速度和定量检测等方面存在着许多不足之处，同时由于所需专用仪器和试剂昂贵，其并不适宜于对肿瘤进行大规模的筛选和普查。基于对肿瘤标志物进行快速测试的目的，许多小型，半自动且便携的免疫传感器（Immunosensors）被发展了起来。免疫传感器是一种重要的分析工具，它可以实时检测结合着的抗体和抗原而不需要对它们进行分离和洗涤，有利于对免疫反应进行动力学分析[8]。免疫传感器的发展可促使免疫诊断方法向定量化、操作自动化方向发展。免疫传感器检测装置通常有四种：电化学免疫传感器、光学免疫传感器、质量检测免疫传感器的和热量检测免疫传感器[9]。但是，常用于临床的肿瘤标志物免疫传感器为电化学免疫传感器。电化学免疫传感器是通过检测免疫反应所引起的电势、电流、电容、电导及电阻的变化来进行检测分析的，其简化了肿瘤标志物的检测过程，具有较高的灵敏度。近年来，随着电化学免疫传感器与流体注射分析技术及毛细血管电泳分析技术的结合，更加提高了其肿瘤标志物的检测灵敏度，并且这些检测方法经济、高效，使得其具有很好的临床使用前景[10]。比如2004年Guan等建立的用普鲁士蓝改良的电流流体注射分析生物传感器就能只通过一步检测肿瘤标志物甲胎蛋白[11]。尽管电免疫传感器给临床肿瘤标志物检测提供了高效、简捷的途径，但是由于它在灵敏度上的缺陷，目前还很难取代传统的肿瘤标志物免疫测定方法。

3 微阵列系统

随着技术的发展，要求同时测定血液或其它组织中多种分

［收稿日期］2007-06-05 ［修回日期］2007-08-06

维普资讯 http://www.cqvip.com

析物的要求在医学研究中日益明显。因此,在发展高通量分析方法的努力下,能够研究功能和表达蛋白组学的蛋白微阵列系统(Microarray System)发展了起来[12]。微阵列系统不仅可以允许对小型样本中多种标志物进行高通量的测定,而且还可以显著地减少测定所需的时间[13],为提高肿瘤标志物的辅助诊断价值,进行肿瘤标志物的联合检测提供了可能。目前,对肿瘤标志物的联合检测有两种不同的意见,一种是通过严格筛选、科学分析后进行肿瘤标志物的组合,以有针对性地进行检测,避免卫生资源的浪费和加重病人的经济负担;另一种是利用生物芯片技术,将目前能用于诊断的肿瘤标志物尽可能地点在一张芯片上进行检测,以充分获得信息,提高诊断的灵敏度。但无论是哪一种意见,快速、准确地检测出肿瘤标志物都是其存在的前提。微阵列系统在一定程度上,检测目标蛋白需要选择合适的捕获分子。因此,新的快速生产许多特异抗体和不同类型捕获分子的方法孕育而生。Song 等建立的抗体片断微阵列系统便能同时快速的检测 AFP、CEA、β-HCG、CA125、CA19-9、CA15-3 等肿瘤标志物[14]。其与传统的肿瘤标志物免疫测定相比较,在对肿瘤的系列标志物检测时具有更好的实用性。

4 蛋白指纹技术

蛋白指纹技术(Protein fingerprinting)也称表面增强激光解吸离子化飞行时间质谱技术(SELDI-TOF-MS)。血清蛋白组学模式诊断技术是一种新型的蛋白组学平台,在此平台上通过高维质谱所获得的蛋白指纹图谱可用做疾病的诊断标准,此技术在早期肿瘤的检测中具有巨大应用前景。目前发现通过 SELDI 蛋白指纹技术所获得的生物标记物,大多数是在特异性肿瘤微环境中所产生的低分子质量蛋白碎片,通过多种肿瘤的检测表明,其敏感性和特异性均优于传统的肿瘤标记物,对某些肿瘤的敏感性已达 100%,特异性也超过 95%,因而在肿瘤早期诊断和早期预警中具有重要临床应用价值。Petricoin 等报道,用表面增强激光解吸离子化飞行时间质谱技术发现了卵巢癌的特异性低分子肽,其灵敏度为 100%,特异性为 95%,阳性预测值为 94%,对卵巢癌的诊断有重要意义[15]。近期的研究也表明,表面增强激光解吸离子化飞行时间质谱技术对卵巢癌的检测具有较高的敏感性和特异性[16]。虽然表面增强激光解吸离子化飞行时间质谱技术被用于组织和细胞株的细胞溶解产物分析,但是临床上希望将其运用于更加容易获得的体液检测,因此我们需要建立各种重要类型癌症的血清蛋白质谱,以利于临床上更好的使用该方法检测肿瘤标志物。然而,考虑到蛋白质谱的重复性和生物标志物的有效性,必须重视来自于不同实验室和多重样本组合的不同结果。只有科学的分析并合理的采纳这些试验结果,才能使蛋白指纹技术能够真正的适用于临床肿瘤标志物的检测。

肿瘤标志物的筛选和鉴定对肿瘤的诊断和治疗具有重要意义,传统的方法是通过在系列生化、生理和分子生物学研究中比较不同肿瘤中不同基因及其产物的表达水平,以此鉴定出各种肿瘤的特异性标志物。随着蛋白质组学技术、高通量技术以及生物信息学技术的发展,必将对筛选和鉴定新的肿瘤特异性标志物产生革命性的影响,并为临床肿瘤的防治及预后判断提供可靠的科学支持。

[参考文献]

[1] McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, et al. REporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK)[J]. Br J Cancer, 2005,93(4):387-391.

[2] Gadducci A, Cosio S, Carpi A, et al. Serum tumor markers in the management of ovarian, endometrial and cervical cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2004,58(1):24-38.

[3] Patankar MS, Jing Y, Morrison JC, et al. Potent suppression of natural killer cell response mediated by the ovarian tumor marker CA125[J]. Gynecol Oncol, 2005,99(3):704-713.

[4] Lin J, Ju H. Electrochemical and chemiluminescent immunosensors for tumor markers[J]. Biosens Bioelectron, 2005,20(8):1461-1470.

[5] 李春海. 加强肿瘤生物学标志的研究和评价[J]. 中华检验医学杂志, 2000,23(1):6-8.

[6] Wesseling S, Stephan C, Semjonow A, et al. Determination of non-alpha-antichymotrypsin-complexed prostate-specific antigen as an indirect measurement of free prostate-specific antigen: analytical performance and diagnosis accuracy[J]. Clin Chem, 2003,49(6):887-894.

[7] Deng YF, Chen P, Lin YZ, et al. Analytical and clinical ecaluation of CYFRA21-1 by electrochemiluminescent immunoassay in head and neck squamous cell carcinoma[J]. J Laryngol Otol, 2003,117(3):190-194.

[8] 温志立,汪世平,沈国励. 免疫传感器的发展概述[J]. 生物医学工程学杂志, 2001,18(4):642-646.

[9] Luppa PB, Sokoll LJ, Chan DW. Immunosensors--principles and applications to clinical chemistry[J]. Clin Chim Acta, 2001,314(1-2):1-26.

[10] He Z, Jin W. Capillary electrophoretic enzyme immunoassay with electrochemical detection for thyroxine[J]. Anal Biochem, 2003,313(1):34-40.

[11] Guan JG, Miao YQ, Chen JR. Prussian blue modified amperometric FIA biosensor: one-step immunoassay for alpha-fetoprotein[J]. Biosens Bioelectron, 2004,19(8):789-794.

[12] MacBeath G. Protein microarrays and proteomics[J]. Nat Genet, 2002,32(Suppl):526-532.

[13] Lopez MF, Pluskal MG. Protein micro- and macroarrays: digitizing the proteome[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2003,787(1):19-27.

[14] Song SP, Li B, Hu J, et al. Simultaneous multianalysis for tumor markers by antibody fragments microarray system[J]. Analytica Chimica Acta, 2004,510(2):147-152.

[15] Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer[J]. Lancet, 2002,359(9306):572-577.

[16] Zhang Z, Bast RC Jr, Yu Y, et al. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer[J]. Cancer Res, 2004,64(16):5882-5890.

(编辑:朱志立)