

肿瘤标志物的研究进展

梁延春, 郭军华(军事医学科学院附属医院临床药理室, 北京 100039)

摘要: 肿瘤标志物的研究正处于飞速发展的阶段, 许多先进技术用作肿瘤标志物的研究, 越来越多的肿瘤标志物被发现, 现对肿瘤标志物的研究手段及现阶段发现的肿瘤标志物进行介绍。

关键词 肿瘤标志物; 技术

中图分类号: R730.45 文献标识码: B 文章编号: 1006-0111(2004)03-0132-03

蛋白质是生命的基础, 人体各种疾病的发展阶段与体内蛋白质的动态变化一一对应。肿瘤患者体内某些上调或下调蛋白质都可能用于疾病诊断、检测、疗效评价的肿瘤标志物。随着生物技术的发展, 研究手段越来越多, 技术越来越先进, 肿瘤标志物的研究正处于飞速发展的阶段, 越来越多的肿瘤标志物被发现、应用。肿瘤标志物的研究必将为提高人类的健康水平作出巨大的贡献。

1 研究手段

目前用于蛋白质组学研究的主要技术有蛋白质芯片(proteinchip array)系统、蛋白质微阵列(protein microarrays)技术、双向凝胶电泳(two-dimensional gel electrophoresis, 2DE)、质谱技术(mass spectrometry, MS)。

1.1 蛋白质芯片系统 蛋白质芯片(ProteinChip Array)仪器由美国 Ciphergen 公司研制, 主要包括三个基本部分: ①特殊材料制成的固相载体, 即蛋白芯片阵列(proteinchip array), 蛋白芯片阵列呈 10mm 宽、80mm 长的条索状外形, 其中包含着 8~16 个直径为 2mm 的圆形孔斑, 亦被称为芯池。组成芯池的特殊材料是根据要捕获蛋白质的属性而设计, 概括起来可归纳为化学型材料和生物化学型材料两大类型。②蛋白质芯片解读仪(proteinchip reader), 它是安装有脉冲式紫外线/氮激光光源的解析离子化(laser desorption ionization, LDI)时间飞行质谱仪(TOF MS)。③蛋白质芯片软件控制分析系统(software) SELDI-TOF MS 控制分析软件, 由 Ciphergen 公司研发, 软件控制分析系统使整个操作过程变得自动化、简捷化、人性化。工作原理: 芯池中的样本受到激光激发后, 基质分子吸收激光能量, 样品解吸附, 基质一样品之间发生电荷转移使样品分子电离, 经解析/离子化过程而形成气化离子状态, 它们进入 TOF-MS 区域飞行。质量较轻的离子飞

行速度快, 较早到达检测器, 较重的离子飞行速度慢, 较晚到达检测器, 离子飞行时间与其质荷的平方根(m/z)^{1/2}成正比, 根据蛋白质通过离子室的飞行速度, 得出每个蛋白质的质量/电荷比(m/z)。经过计算机处理后, 检测到的蛋白质用一系列峰波表示出来, 而这一复杂过的完成则是通过联结到电脑上的高速模拟-数字转换器实现的。

1.2 蛋白质微阵列技术 蛋白质微阵列是应用平面上的有序排列的许多管、腔(孔)或各自独立的点来进行样本分析的, 其分析效率与平面上的样本密度直接相关, 理想的平面是滤过膜(如硝化纤维素、尼龙膜或聚双氟乙烯膜), 或覆盖有各种试剂的玻璃片(如多聚左旋赖氨酸、聚丙烯酰胺)。蛋白质微阵列制备可以通过点样仪高度自动化地完成, 检测是通过放射性元素或荧光素标记, 由电荷藕荷器件(CCD)或激光扫描系统来实现的。

1.3 双向凝胶电泳 双向凝胶电泳技术是蛋白质组学的关键技术, 是目前分离蛋白质的较好方法, 其基本原理是根据蛋白质等电点和分子量的差异而使之分别在等电聚焦和聚丙烯酰胺凝胶电泳中分离出来。

1.4 质谱技术 质谱在蛋白质组学研究中起着重要的作用, 也是蛋白质组学发展的一个重要推动技术。基质辅助激光解吸离子化质谱是应用较多的一种质谱技术, 可以通过飞行时间、四极杆与离子阱产生限制参数, 将这些质谱数据与序列数据库进行相关分析, 可对蛋白质进行鉴定。

2 现阶段研究进展

2.1 前列腺癌标志物 Xiao 等^[1]利用抗体芯片研究前列腺癌患者组织和体液标本, 发现分子量为 33 000 和 18 000 Da 的蛋白质在前列腺癌细胞中皆上调。血清中前列腺特异性抗原(prostate specific antigen, PSA)检测试验被广泛应用于前列腺癌患者的临床筛选, Jr^[2]等人运用表面加强激光解析电离飞行时间质谱(surface enhanced laser desorption/

ionization SELDI-TOF MS) 技术对前列腺癌患者的组织及体液中细胞裂解物进行检测,不但快速、准确地检测到前列腺癌患者的 PSA,而且在前列腺癌患者的血清中发现 3 种具有免疫球蛋白结合因子(Ig-BF)活性的蛋白质,它们的分子量分别为 10 769、10 644 及 11 253Da,对前列腺癌的早期诊断有重要意义。Adam^[3]运用同样的技术在前列腺癌患者的尿液中发现 9 个蛋白质与正常人及前列腺增生患者尿液中的蛋白质含量不同,其灵敏度可达 83%,特异性为 97%,阳性预测率值为 96%。Wellmann^[4]利用激光辅助显微切割技术取得纯净细胞间质、上皮及癌细胞,经分析发现分子量在 1.5~30kD 间多个特异性蛋白质峰;与前列腺组织及移行区域比较,癌肿腺体及间质中出现一个 4.3kD 的特异性波峰。

2.2 肺癌标志物 Brichory 等^[5]用肺癌患者的血清与相应肿瘤组织的 2-DE 分析结果进行抗原抗体反应,经过蛋白鉴定后,发现一种存于肺癌患者血清中的蛋白产物 PGP9.5。PGP9.5 是一种神经特异性多肽,有机体免疫反应产生。Zhukov^[6]等利用激光辅助显微切割技术取得肺癌组织、非典型腺瘤样增生组织以及正常组织的细胞,用 SELDI-TOF MS 技术测定发现,肺癌细胞中有 3 种蛋白质(分子量 17~23 kD)表达明显增加,其中分子量为 17.25kD 的蛋白质在正常细胞中未检测到,在非典型腺瘤样增生组织为低表达。

2.3 膀胱癌标志物 Vlahou^[7]等学者收集 94 份尿液样本,其中包括膀胱移行细胞肿瘤患者(transitional cell carcinoma of the bladder, TCC),正常人和泌尿系其它良性疾病。TCC 病人组中发现 5 个新的特异性蛋白标志物和 7 个蛋白质簇(分子量范围在 3.3~133 kD)。利用 SELDI-TOF MS 技术,检测 TCC 蛋白标志物的灵敏度为 87%,特异性达 66%;而根据传统的方法,在膀胱灌洗液中寻找肿瘤细胞的灵敏度仅为 33%。

2.4 乳腺癌标志物 Paweletz 等应用 SELDI-TOF MS 技术对乳头吸取液进行蛋白质组学检查,在对 12 个乳腺癌患者及 15 个健康对照者的检查对比中,发现乳腺癌患者 4 233kD 和 9 470kD 分子量的蛋白质含量明显增高。研究表明,在不同乳腺癌临床病理类型和分期中蛋白质的表达形式也有所不同。Li 等将乳腺癌患者进行临床分期:0 期 4 人, I 期 38 人, II 期 37 人, III 期 24 人,并设立对照组 41 人,其中 25 人为乳腺其它良性病变,其余为健康者。他们抽取患者血清利用 IMAC3 镍螯合金属芯片,发现 0 期和 I 期患者血清中有 3 种蛋白质含量明显不同于无瘤者和 II 期、III 期患者,为早期诊断乳腺癌

提供了可靠依据。

2.5 胰腺癌标志物 胰腺癌早期临床表现不显著,当有明显临床症状时,癌肿多属晚期。近年来国内外努力寻找胰腺癌特异性抗原物质,如 CEA、CA19-9、PCAA、PaA 和白细胞粘附抑制试验(LAIT)等。但是目前临床上所用的各种抗原对胰腺癌虽有一定阳性率,都不具有特异性,仅供临床参考。因此,目前寻找胰腺癌特异性肿瘤标志物尤为重要。Christophe^[10]等应用 SELDI-TOF MS 蛋白质芯片技术对抽取的胰液样本进行研究分析,发现胰腺肿瘤患者及其它胰腺疾病患者都存在一种特异性蛋白质,分子量为 16,570D,该蛋白质在胰腺肿瘤患者中的检出率为 67%(10/15),在其它胰腺疾病患者中的检出率为 14%(1/7),经证实该蛋白质为肝-肠-胰相关蛋白 I(HIP/PAP-I)。胰腺肿瘤患者组与对照组相比,HIP/PAP-I 在胰液中及血清中的水平都明显增高($P < 0.001$)。他们进一步研究得出:胰液中 HIP/PAP-I 水平升高尤为明显,当浓度 $\geq 20\mu\text{g/mL}$ 时,患胰腺癌的可能性较浓度 $< 20\mu\text{g/mL}$ 高出 21.9 倍。

2.6 卵巢癌标志物 Petricoin^[11]等利用 SELDI-TOF MS 技术对 50 例健康女性及 50 例卵巢癌患者的血清进行分析,发现荷质比为 534、989、2111、2251、2465 处的 5 个波峰同时变化(与健康人相比,患者血清中 2251 波峰下降,其余均升高)。将这一蛋白质波谱模型用于分析 116 个未标记的血清样本,诊断卵巢癌敏感性为 100%,特异性为 95%,阳性预测值为 94%。

2.7 大肠癌标志物 手术治疗早期大肠癌的 5 年生存率可达 99%,效果良好,但由于各种因素的影响对高危人群的筛选及对大肠癌的早期诊断率只有 37%,所以对大肠癌的早期诊断尤为重要。Roboz^[12]等分析大肠癌患者(34 例)与正常对照组(14 例)之间的血清蛋白图谱的差异,其中大肠癌患者高表达(8.942 \pm 5.3 kD)蛋白质,而 9.3kD 的蛋白质呈低表达,正常对照组上述两种蛋白质的表达情况与患者组正好相反。实验结果表明 8.9kD 和 9.3kD 蛋白质可作为检测大肠癌的肿瘤标记物。

2.8 肝癌标志物 Poon^[13]等对 20 例 AFP $< 500\mu\text{g/L}$ 和 38 例肝癌患者用金属铜芯片和弱阳离子芯片进行测定,并结合生物信息学方法寻找肿瘤相关蛋白质组学变化。发现 250 余种蛋白质在肝癌和慢性肝病中表达明显不同。

3 肿瘤标志物研究前景

生物技术的发展,为研究蛋白质的特征、属性、

功能提供了快速、准确、高效的技术平台,使得以前极其复杂的研究过程变得简单快速,研究成果日新月异。然而,肿瘤早期检测的基础—肿瘤标志物研究尚处于研究室探索阶段,目前的成果尚处于发现阶段,将其用于临床检测也仅仅是对实验室研究结果的对照。但是,如同一切对人类生活有过重大影响的科学研究一样,肿瘤标志物的研究必将对人类生活产生重大影响,对它的研究已经站到了生命科学研究的前沿。下一步的研究将可能向下面的方向发展:①展开所有癌症种类肿瘤标志物的基础研究,尽可能多的发现特异表达的肿瘤标志物。②对已发现的肿瘤标志物进行临床应用研究,扩大临床验证范围,对有效的蛋白质波谱模型进行确定。③对特异表达的肿瘤标志物进行提纯、确定结构,为下一步研究提供原材料。④制定现阶段的临床应用标准,争取早日将科研成果应用于临床。

参考文献:

[1] Xiao Z, Jiang X, Beckett ML, *et al.* Generation of a baculovirus recombinant prostate-specific membrane antigen and its use in the development of a novel protein biochip quantitative immunoassay[J]. *Protein Expr Purif*, 2000, 19(1): 12.

[2] Jr GW, Cazares LH, Leung SM, *et al.* Proteinchip surface enhanced laser desorption/ionization (SELDI) mass spectrometry: a novel protein biochip technology for detection of prostate cancer biomarkers in complex protein mixtures[J]. *Prostate Cancer and Prostatic Dis*, 1999, 2(5/6): 264.

[3] Adam BL, Vlahou A, Semmes OJ, *et al.* Proteomic approaches to biomarker discovery in prostate and bladder cancers[J]. *Proteomics*, 2001, 1(10): 1264.

[4] Wellmann A, Wollscheid V, Lu H, *et al.* Analysis of microdissected prostate tissue with ProteinChip arrays—away to new

insights into carcinogenesis and to diagnostic tools[J]. *Int J Mol Med*, 2002, 9(4): 341.

[5] Brichory F, Beer D, Le Naour F, *et al.* Proteomics-based identification of protein gene product 9.5 as a tumor antigen that induces a humoral immune response in lung cancer[J]. *Cancer Res*, 2001, 61(21): 7908.

[6] Zhukov TA, Johanson RA, Cantor AB, *et al.* Discovery of distinct protein profiles specific for lung tumors and pre malignant lung lesions by SELDI mass spectrometry[J]. *Lung Cancer*, 2003, 40(3): 267.

[7] Vlahou A, Schellhammer PF, Mendrinos S, *et al.* Development of a novel proteomic approach for the detection of transitional cell carcinoma of the bladder in urine[J]. *Am J Pathol*, 2001, 158(4): 1491.

[8] Pawelcz CP, Trock B, Pennanen M, *et al.* Proteomic patterns of nipple aspirate fluids obtained by SELDI-TOF: potential for new biomarkers to aid in the diagnosis of breast cancer[J]. *Dis Markers*, 2001, 17(4): 301.

[9] Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, *et al.* Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer[J]. *Clin Chem*, 2002, 48(8): 1296.

[10] Rosty C, Christa L, Kuzdzal S, *et al.* Identification of hepatocarcinoma-intestine-pancreas/pancreatic islet-associated protein 1 as a biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma by protein biochip technology[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(6): 1868.

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

[12] Roboz J, Ma LH, Sung M, *et al.* protein profiles of serum in colon cancer by SELDI-TOF mass spectrometry[J]. *Proteomics poster session AACR*, 2002, 190.

[13] Poon TC, Yip TT, Chan AT, *et al.* Comprehensive proteomic profiling identifies serum proteomic signatures for detection of hepatocellular carcinoma and its subtypes[J]. *Clin Chem*, 2003, 49(5): 752.

收稿日期:2004-03-02

• 药物不良反应 •

阿司米唑致皮肤瘙痒、皮疹 1 例

陈素来¹, 孙志军² (1. 响水药品监督管理局, 2. 响水县第二人民医院; 江苏 响水 224600)

中图分类号: R976 文献标识码: D 文章编号: 1006-0111(2004)03-0134-01

1 临床资料

患者,男,42岁,体重58kg,响水县小尖街人,无即往药品过敏史和家族药品不良反应史。患者因鼻内红肿、胀痛、流鼻涕,于2003年10月26日到响水县第二人民医院门诊就医,经医生诊断为过敏性鼻炎,给予阿司米唑片剂(西安杨森制药有限公司,批号:0211124-3)口服,9mg/d,患者自服药后,出现皮肤瘙痒、大面积皮疹,高于皮肤表面,逐渐遍及全

身。第2天,患者又去该院就医,医生嘱咐立即停药观察,后逐渐好转,第3天痊愈。

2 讨论

临床上常用阿司米唑片剂口服抗过敏,但出现过敏反应,实属罕见,特此报告,以引起重视。用药后要严密观察有无用药反应,以免延误病情。

收稿日期:2004-02-06