

- [20] Grallert H, Sedlmeier EM, Huth C, et al. APOA5 variants and metabolic syndrome in Caucasians[J]. J Lipid Res, 2007, 48(12): 2614-2621.
- [21] Kisfali P, Mohás M, Maász A, et al. Haplotype analysis of the apolipoprotein A5 gene in patients with the metabolic syndrome [J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2010, 20(7): 505-511.
- [22] Ong KL, Jiang CQ, Liu B, et al. Association of a genetic variant in the apolipoprotein A5 gene with the metabolic syndrome in Chinese[J]. Clin Endocrinol, 2011, 74(2): 206-213.
- [23] Dorfmeister B, Cooper JA, Stephens JW, et al. The effect of APOA5 and APOC3 variants on lipid parameters in European whites, In-

· 综 述 ·

dian Asians and Afro-Caribbeans with type 2 diabetes[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1772(3): 355-363.

- [24] 瞿光华, 闻平, 郭兰芳, 等. II 型糖尿病患者 APOA5-1131 T>C 基因多态性与血脂代谢和胰岛素抵抗的关系研究[J]. 遗传, 2007, 29(5): 541-546.

- [25] Cabré A, Lázaro I, Girona J, et al. The APOA5-1131 T>C variant enhances the association between RBP4 and hypertriglyceridemia in diabetes[J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2010, 20(4): 243-248.

(收稿日期:2011-12-28)

肺癌血清蛋白质组学研究及应用进展

李 克, 刘 辉 综述, 汪俊军 审校

(南京军区南京总医院检验科, 南京 210002)

关键词: 蛋白质组学; 肺肿瘤; 血清; 综述

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2012.05.021

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)05-0556-03

肺癌是严重危害人类健康和生命的恶性肿瘤之一,其发病率和患者死亡率呈上升趋势。现有的影像学、组织(细胞)病理学、支气管镜检等检测难以实现肺癌早期诊断。对肺癌发病机制、肺癌细胞抗药性及肺癌进程所涉及细胞通路的认识均不够深入。更重要的是,尚未能发现预测肺癌进程和疾病分期的可靠标志物。基因是遗传信息的携带者,但生命活动的执行者却是蛋白质。蛋白质组学以细胞内全部蛋白质的存在及其活动方式为研究对象,是后基因时代生命科学研究的核心内容^[1]。在肺癌发生、发展过程中,许多蛋白质发生异常变化,包括表达量、蛋白质翻译后加工、修饰,蛋白质分子间或与其他生物分子间的相互作用等均有可能发生变化。上述一系列改变所导致的细胞信号通路异常与肿瘤发生、发展密切相关。因此,动态、全面的血清蛋白质组学分析将有助于更加完整、真实地揭示肺癌的发病机制,寻找诊断标志物,为肺癌的诊断、预防和治疗提供依据。近年来肺癌血清蛋白质组学研究及应用已取得了一系列的进展。

1 在肺癌早期诊断中的应用

肺癌患者早期均无明显症状,超过 2/3 的患者往往在局部进展或出现远处转移时才被发现,失去了最佳治疗时机。患者体内出现肿瘤细胞后,其分泌的某些蛋白质被释放入血液中,通过对血清蛋白质组动态全面的分析,可以探查出疾病早期微小的变化和征兆,为临床医生提供诊断参考。

血清中含有种类众多的低丰度蛋白质,能够提供大量关于机体健康以及疾病状态的信息,从中可发现诊断疾病的特异性标志物,或新的药物作用靶蛋白。利用免疫亲和色谱去除血清中高丰度蛋白质后,将低丰度蛋白质分组并分别利用不同荧光染料标记,以二维荧光差异凝胶电泳(2D-DIGE)进行定量分析,可分离获得约 3 890 个蛋白质点,其中 364 个蛋白质点在肺癌患者中比健康对照者高 2 倍以上($P < 0.05$)^[2]。应用微量液相色谱联合电喷雾质谱分析技术对Ⅲ B 期或Ⅳ 期肺腺癌患者以及健康人的血清进行检测,共发现 6 种低相对分子质量差异蛋白质,其中 5 种表达升高,1 种表达降低。有 4 种差异蛋白质有可能成为新的肺癌肿瘤标志物^[3]。Liu 等^[4]采用表面增强激光解析离子化飞行时间质谱技术(SELDI-TOF-MS)

检测肺癌和健康人血清样本后发现,肺癌患者有 3 个蛋白质峰表达明显降低,以其为诊断标志进行酶联免疫吸附试验,区分肺癌患者与健康人的灵敏度为 78.5%,特异度为 77.5%。提示对于临床高度怀疑肺癌但无法取得病理证实的患者,血清蛋白质组检测具有一定的参考价值。

肺癌患者、健康人及肺部良性疾病患者的血清差异蛋白质组学研究有助于筛选、鉴定差异蛋白质,若能以此为依据建立分类树诊断模型,其诊断灵敏度及准确性大大高于传统方法^[5-6]。周继红等^[7]用 SELDI-TOF-MS 技术、弱阳离子交换蛋白质芯片,检测肺癌和肺部良性病变患者的血清蛋白质质谱图,用 Biomarker Pattern 软件分析差异蛋白质并建立其诊断模型,结果发现有 20 个蛋白质峰有统计学差异,其中肺癌患者血清高表达蛋白质峰 14 个,低表达蛋白质峰 6 个,诊断肺癌的灵敏度和特异度分别为 88% 和 95%。Yang 等^[8]对肺癌患者和健康对照者血清进行分析,发现了 18 个蛋白质峰异常表达。选其中 5 个蛋白质峰建立肿瘤标志物图谱。经盲法检测发现其诊断非小细胞肺癌(NSCLC)的灵敏度达 91.4%。对于早期肺癌(I / II 期)的诊断灵敏度为 79.1%,远超过了目前临床使用的肿瘤标志物。

2 在肺癌分型中的应用

发现与病理分期相关的具有高灵敏度和特异度的标志物,将有助于制定有效的临床治疗决策。由于以解剖学为基础的恶性肿瘤 TNM 分期系统存在不足,许多学者开始研究分子标志物对肿瘤分期的应用,但目前结果尚不一致,可能与研究样本量较小、试验过程中易产生误差,以及截点选择标准不统一等因素有关。Han 等^[9]用 SELDI-TOF-MS 蛋白质芯片系统对小细胞肺癌(SCLC)患者、NSCLC 患者、肺炎患者以及健康对照者血清样本进行了检测,发现 4 个蛋白质峰可以区分 SCLC 患者与健康对照者,其灵敏度和特异度分别是 88.9% 和 85.7%;2 个蛋白质峰可以区分 SCLC 和肺炎患者,其灵敏度和特异度分别是 88.9% 和 91.7%;3 个蛋白质峰可以区分 SCLC 和 NSCLC 患者,其灵敏度和特异度分别是 83.3% 和 75.0%。上述结果表明,SELDI-TOF-MS 蛋白质组学检测可有效提高 SCLC、NSCLC 的诊断和鉴别诊断效率。此外,应用

弱阳离子交换芯片(WCX2)检测血清标本后,用 SELDI-TOF-MS 技术建立肺癌患者血清蛋白质组构型,并分析构型的改变,可初步确定肺癌肿瘤标记物与临床分期的关系。现已发现有 5 个蛋白质峰可作为肺腺癌的潜在标记物,其中有 2 个特异性蛋白质与肺腺癌病理分期密切相关。这有助于临床医师制定有效的临床决策,也可能有助于肺腺癌患者的预后判断^[10]。

3 在肺癌转移中的应用

肺癌的发生过程是一个涉及多基因、多阶段、多因子的复杂过程,血清蛋白质组学研究有助于监测肺癌转移^[11]。张雪梅等^[12]采集了肺癌伴或不伴骨转移患者的血清样本,经去除高丰度蛋白质、除盐浓缩处理后,用不同的染料进行交叉标记和 2D-DIGE 检测,利用 DeCyder 软件比较、分析电泳谱中的差异蛋白点,结合基质辅助激光解析离子化飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)进行鉴定,结果发现与肺癌无骨转移组相比,肺癌骨转移组血清蛋白质中有 16 个点的差异有统计学意义(11 个蛋白质表达水平增加,5 个蛋白质表达水平下降),对其中 5 个差异蛋白点进行胶内原位酶解、肽指纹图谱分析,经数据库查询鉴定有 4 种蛋白质可能与肺癌转移的发生、发展有关。

4 在肺癌个性化治疗中的应用

肿瘤治疗正朝着个性化的方向发展,个性化治疗不仅要根据肿瘤细胞的病理类型,更要综合分析患者对各种治疗方法的反应及不良反应。目前,尚没有肿瘤标志物可用于从术后患者中准确识别出死亡危险度较高的患者,从而将其作为接受术后辅助治疗或其他方式治疗的对象。蛋白质组学研究是发现具有上述重要临床意义的生物标志物及治疗靶点的好方法,在肿瘤预防及个性化治疗方面具有良好的应用前景,也有助于实现基础研究成果向临床个性化治疗的转化^[13]。利用已商品化的血清蛋白质组学分期技术,可以将复发的晚期 NSCLC 患者划分为厄罗替尼和贝伐单抗治疗预后良好组和无效组,这将有助于患者自主决定是否使用上述两种昂贵且有潜在毒性的药物^[14]。近年来,吉非替尼在 NSCLC 治疗中的应用倍受关注,但其用药适应证甚为模糊,目前尚无明确结论。对准备接受吉非替尼治疗的 NSCLC 患者,可在服药前进行 SELDI-TOF-MS 检测,如患者血清蛋白质指纹特征符合低表达或高表达的用药指征,则接受吉非替尼治疗会有较好疗效^[15]。

许多研究表明,肿瘤细胞耐药性与某些蛋白质的高表达有关。应用蛋白质组学技术研究耐药机制,发现与肿瘤耐药相关的蛋白质,有助于在患者接受化疗前预测化疗疗效,为患者提供个性化治疗方案。蛋白质组学研究可用于确定化疗药物的治疗靶点及影响药物作用的蛋白质,分析这些蛋白质及信号传导通路与细胞生长调控之间的关系,将有助于阐明药物作用机制,为新的治疗药物的开发奠定基础^[16]。Cai 等^[17]利用放射元素标记后进行血浆蛋白质组学研究,以方差分量模型鉴定接受放射治疗的 NSCLC 患者蛋白质表达差异谱,结果发现在辐射诱导肺中毒程度大于或等于 2 级的患者中,蛋白组特异蛋白均明显高表达于分期相同,但尚未引起毒性的患者。因此,这些新的血浆蛋白有可能成为鉴定化疗效果的标志物,为患者选择合适的治疗方案提供依据。

5 问题与展望

血清中含有丰富的蛋白质,蕴藏了机体所有主要生物过程的线索。直接从蛋白质整体水平入手,分离、鉴定和分析肺癌患者血清蛋白质表达谱及其差异特征,对探索肺癌发病机制,早期诊断,分型及转移分析,患者个性化治疗等具有重要意义。

目前,与肺癌相关的蛋白质组学研究已取得初步进展,建立了关于肺癌的蛋白质组数据库,为蛋白质组学研究在肺癌诊治中的临床应用奠定了良好的基础。然而,由于血清蛋白质组分极其复杂,且丰度差异巨大,给血清蛋白质谱检测及分析带来极大困难。其次,各种蛋白质组学研究技术尚不完善,使蛋白质组学研究在肺癌诊治中的进一步应用尚面临巨大挑战。随着更多适用于血清蛋白质组学研究的技术体系的探索、建立和发展,将为进一步深入了解血清蛋白质组成及性质,揭示肺癌发病机制,提高肺癌早期诊断率,寻找有效的药物治疗靶点,以及研制和应用蛋白质治疗药物奠定基础。

参考文献

- [1] 蒋瑾,张波,府伟灵.蛋白质组学技术发展及应用研究进展[J].国际检验医学杂志,2009,30(3):252-254.
- [2] Okano T,Kondo T,Kakitsuka T,et al. Plasma proteomics of lung cancer by a linkage of multi-dimensional liquid chromatography and two-dimensional difference gel electrophoresis[J]. Proteomics, 2006,6(19):3938-3948.
- [3] Heo SH,Lee SJ,Ryoo HM,et al. Identification of putative serum glycoprotein biomarkers for human lung adenocarcinoma by multilectin affinity chromatography and LC-MS/MS[J]. Proteomics, 2007,7(23):4292-4302.
- [4] Liu L,Liu J,Dai S,et al. Reduced transthyretin expression in sera of lung cancer[J]. Cancer Sci,2007,98(10):1617-1624.
- [5] 高春芳,赵光,王秀丽,等.肺癌患者血清蛋白质组的特征研究[J].解放军医学杂志,2010,35(4):439-441.
- [6] 韩明勇,刘奇,余捷凯,等.血清蛋白质指纹图谱与人工神经网络模型在肺癌诊断中的应用[J].山东大学学报:医学版,2008,46(6):604-607.
- [7] 周继红,柳广南,黄斯明,等. SELDI 技术筛选肺癌患者血清标志蛋白的临床价值[J].山东医药,2010,50(5):18-19.
- [8] Yang SY,Xiao XY,Zhang WG,et al. Application of serum SELDI proteomic patterns in diagnosis of lung cancer[J]. BMC Cancer, 2005,5(83):1471-1490.
- [9] Han M,Liu Q,Yu J,et al. Detection and significance of serum protein markers of small-cell lung cancer[J]. J Clin Lab Anal, 2008,22(2):131-137.
- [10] 罗晓阳,陈海泉,周建华,等.肺腺癌病人血清蛋白质组构型与病理分期的关系[J].中华胸心血管外科杂志,2006,22(2):112-114.
- [11] 孙顺昌,贺敬波.肺癌的分子生物学研究及意义[J].国际检验医学杂志,2007,28(7):635-637.
- [12] 张雪梅,沈影,于志群,等.肺癌骨转移血清蛋白质组学研究[J].中华肿瘤防治杂志,2010,17(9):673-676.
- [13] Koomen JM,Haura EB,Behler G,et al. Proteomic contributions to personalized cancer care[J]. Mol Cell Proteomics,2008,7(10):1780-1794.
- [14] Carbone DP,Salmon JS,Billheimer D,et al. VeriStrat classifier for survival and time to progression in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients treated with erlotinib and bevacizumab[J]. Lung Cancer,2010,69(3):337-340.
- [15] 裴毅,胡守喜,吉利娜,等.蛋白质组指纹作为吉非替尼治疗肺癌适应症筛选标准的初步验证报告[J].现代生物医学进展,2009,9(7):1288-1290.
- [16] Paredes LA,Blanco GC,Echenique EM,et al. Expression of proteins associated with multidrug resistance and resistance to chemotherapy in lung cancer[J]. Arch Bronconeumol, 2007, 43 (9):

479-484.

2010, 77(3): 867-876.

- [17] Cai XW, Shedd K, Ao X, et al. Plasma proteomic analysis may identify new markers for radiation-induced lung toxicity in patients with non-small-cell lung cancer[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys,

(收稿日期:2011-12-31)

· 综述 ·

不同实时荧光定量聚合酶链反应技术研究进展

陈淑云,采云综述,陈激扬审校

(武警北京市总队医院检验科,北京 100024)

关键词:聚合酶链反应; 荧光探针; 综述**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2012.05.022**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2012)05-0558-03

聚合酶链反应(PCR)由美国 PE 公司 K. B Mulliss 博士在 1987 年发明^[1]。PCR 技术是指以 PCR 为基础的核酸检测技术,通过对扩增反应,能在短时间内将靶序列放大百万倍甚至千万倍,从而实现靶序列的体外检测及分析。随后发展起来的实时荧光定量聚合酶链反应(RT-PCR)技术既保留了传统 PCR 的优点,又实现了从定性检测到定量检测的飞跃^[2]。目前,RT-PCR 技术作为成熟、有效的分子生物学试验方法,广泛应用于基因突变及病原体的临床检测,在相关科研领域也占有重要地位^[3-4]。笔者现结合多年临床及科研经验及成果,对 RT-PCR 技术和各种荧光探针的应用进行综合性阐述。

1 RT-PCR 技术的原理

RT-PCR 与传统 PCR 的区别在于,RT-PCR 在 PCR 的基础上运用荧光共振转移原理实现荧光能量传递,使荧光探针某一端标记的荧光能量能够淬灭(激发)另一端的荧光能量,以达到检测靶序列的目的^[5]。通过 RT-PCR 分析仪,借助特异性荧光标记探针检测靶序列,即在序列 PCR 扩增的同时进行荧光信号的收集,在 PCR 循环结束时即可对结果进行分析判读。

2 循环阈值(Ct)

Ct 值是 RT-PCR 技术中的一个重要概念,即每个 PCR 反应管中的荧光信号达到设定的阈值所经过的循环数。PCR 反应的前 15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号,缺省设置是 3~15 个循环。研究表明每个 DNA 模板的 Ct 值与该 DNA 的起始拷贝数存在线性关系,拷贝数缺少,Ct 值越小^[6]。

3 荧光探针的种类及反应原理

RT-PCR 技术所需的探针标记由最初的单一荧光染料法(SYBR Green I),发展至特异性更高、重复性更好的荧光标记探针,如 TaqMan 水解探针、Fret 杂交探针、分子信标、Scorpions 探针等。

3.1 SYBR Green I 单一荧光染料 单一荧光染料法是早期最为常用的荧光标记检测方法,即仅采用一种只与 DNA 双链结合的荧光染料,该染料在游离状态下不发出荧光,而在与 DNA 双链结合后可发出荧光^[7]。SYBR Green I 荧光染料能与所有的 DNA 双链结合,对 DNA 模板没有选择性,所以特异性不强。要想用荧光染料法得到比较好的定量结果,对 PCR 引物设计特异性和 PCR 反应质量的要求就比较高,但检测成本较为低廉^[8]。

3.2 水解探针 水解探针即 TaqMan 探针,目前在国内应用较为广泛,是美国应用生物系统(ABI)公司的专利技术。TaqMan 探针是具有较高的特异性,经 Taq 酶 3'→5' 外切核酸酶活性切断探针后产生荧光信号。

在采用 TaqMan 探针的 RT-PCR 体系中,包括 1 对 PCR 引物和 1 条探针。探针只与模板特异性结合,其结合位点在 2 条引物之间^[9]。探针的 5' 端标记有报告基团,如 FAM、VIC 等,3' 端标记有荧光淬灭基团,如 TAMRA^[10]。当探针结构完整时,报告基团所发射的荧光能量被淬灭基团吸收,RT-PCR 分析仪检测不到信号。随着 PCR 的进行,Taq 酶在链延伸过程可结合至已与模板结合的探针,通过 3'→5' 外切核酸酶活性切断探针,报告基团远离淬灭基团,其能量不能被吸收,即可产生荧光信号^[11]。每经过 1 个 PCR 循环,荧光信号也和目的片段一样,存在同步指数增长的过程。所以,TaqMan 探针的荧光信号属于累计信号,可用于基因及 mRNA 的定量检测^[12]。TaqMan 探针与 SYBR Green I 反应各有优缺点,SYBR Green I 主要优点是不用针对每个 PCR 反应设计探针,缺点是其特异性较差,因为 SYBR Green I 是非选择性地与双链 DNA 结合^[13-14]。

对于 TaqMan 探针特异性的改进包括将小槽沟结合剂(MGB)加入探针以提高其 DNA 熔解温度值(Tm 值),也可以设计更短的探针,以降低荧光本底^[15]。实验证明,TaqMan MGB 探针对于富含 A/T 的模板可以区分得更为理想,针对病毒 DNA 的检测效果更为明显,也适合于单核苷酸多态性(SNP)的检测及病毒 DNA 定量检测,不足之处在于不能对未知等位基因进行鉴别,不能重复反应^[16-18]。

3.3 杂交探针 杂交探针即 FRET 探针,目前在国内的应用较少,是罗氏(Roche)公司的专利技术;由 2 条位于靶序列上下游的独立探针组成^[19]。下游探针在 5' 端标记受体荧光基团,上游探针在 3' 标记供体荧光基团(见图 1)。当 2 条探针杂交至靶序列时,形成首尾相连的结构,中间跨度为 1~5 bp^[12]。2 条探针相邻时可发生荧光能量传递,受体基团接受供体集团的能量而激发荧光。供体基团在不同波长下释放能量,与 PCR 过程呈线性关系。与 TaqMan 探针不同的是,FRET 探针属于非累积信号。FRET 探针可通过熔解曲线进行基因突变位点检测(见图 2)。该方法主要用于 Roche 公司 Light Cycle 系列 RT-PCR 分析仪器,适合用于病原体、未知突变位点的检测,优点是可用熔解曲线进行重复分析。

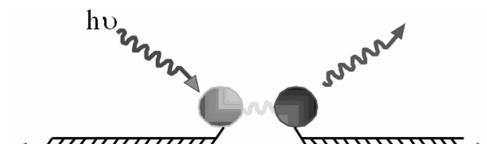


图 1 FRET 探针结构及信号产生机制