・综 述・

# 生物传感器在乳腺癌诊疗中的应用研究进展

张国魁 综述,王安平 审校

(中国人民解放军第二〇五医院检验科,辽宁锦州 121001)

关键词:乳腺癌; 生物传感器; 快速检测

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2015.04.042

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2015)04-0532-03

乳腺癌是来自乳腺终末导管小叶单元上皮的恶性肿瘤[1]。 在全世界范围内,乳腺癌已成为女性最常见的恶性肿瘤,约占 罹患恶性肿瘤女性总数的 23%;病死率逐年上升<sup>[2]</sup>。乳腺癌 的远处转移播散被认为是导致癌症死亡的主要原因。因此,早 期诊断和及时治疗是目前提高生存率最有效的方法[3]。乳房 X线照相术是目前唯一被证实有效应用于乳腺癌早期筛查的 金标准<sup>[4]</sup>。但其依然存在微小癌灶(小于 7.5 mm)不易发 现<sup>[5]</sup>;过于致密乳腺组织的 X 线片难以辨读<sup>[6]</sup>;低能量的 X 射 线存在诱发突变的可能等问题[7]。乳腺组织活检是确诊乳腺 癌的金标准。虽医学指南建议 90% 的乳腺活检应采用针刺活 检,但研究表明大约70%乳腺活检为外科活检,这有可能导致 恶性肿瘤转移[8]。生物传感器是将一种生物识别组分与理化 换能器或传感微系统结合起来的分析设备,能够产生间断或连 续的数字电信号,信号强度与被分析物成比例<sup>[9]</sup>。根据其换能 器原理不同可分为光学型、电化学型和质量型。生物传感器具 备高灵敏度和特异度、简单快捷、非侵入性等优点,在临床检验 诊断、食品安全检验、药品研发及环境监测等领域有广泛应用 前景。早期筛查、辅助诊疗和预后评估乳腺癌需要实现对生物 样本中肿瘤标志物的精确测定和动态监测,飞速发展的生物传 感器无疑是一种理想选择。近年来,研究人员在乳腺癌检测领 域致力于提高生物传感器灵敏度、特异度及稳定性,延长传感 器寿命,实现传感器功能多样化及便携化,取得一些进展和突 破。本文就生物传感器在乳腺癌诊疗中的新进展作一综述,并 对其前景进行展望。

## 1 光学生物传感器

1.1 荧光生物传感器 荧光是一种光致发光现象,由荧光团 吸收入射光(紫外线或电磁射线)光能进入激发态,短时间内迅 速衰减并释放出大于入射光波长的光线,出射光常位于可见光 范围称为荧光。荧光生物传感器具有灵敏度高、成本低廉、易 于实施、可以远距遥测并且有较高生物亲和性的优点,在临床 诊断中有广阔的应用前景<sup>[10]</sup>。Padmanabhan 等<sup>[11]</sup> 巧妙利用 内层覆盖多聚赖氨酸的空心光子晶体光纤有效固定靶蛋白质, 并使用抗雌激素受体抗体作为第一抗体、美国 Alexa Fluor 488 或 555 系列荧光染料标记的羊抗兔 IgG 抗体作为第二抗体成 功构建检测人乳腺癌细胞系 MCF-7 细胞溶解物中雌激素受体 的荧光生物传感器。通过对荧光光谱分析,荧光信号增加与细 胞溶解物中雌激素受体增加呈现线性关系,可在 50 µL 样本中 检测最低 20 pg 雌激素受体蛋白,从而实现雌激素受体超微量 检测。2013 年 Lu 等<sup>[12]</sup>通过对比一系列基于荧光共振能量转 移(fluorescence resonant energy transfer, FRET)在活细胞水 平可视化检测促肿瘤侵袭转移的膜型基质金属蛋白酶-1 (membrane-type 1-Matrix metalloproteinases, MT1-MMP)活 性的生物传感器,确定 AHLR-MT1-MMP 生物传感器具有较 好特异度和最高灵敏度,并证实侵袭性肿瘤细胞黏附于细胞外 基质会促进 MT1-MMP 活性升高。通过进一步优化 AHLR-MT1-MMP 生物传感器成功实现对临床样本中单个乳腺癌细 胞 MT1-MMP 水平检测,为定量显示乳腺癌细胞的侵袭性和 筛选相关抗肿瘤药物提供一个有力工具。

研究表明从细胞表面脱落的定位于 17 号染色体长臂 2 区 1 带的 c-erbB-2 原癌基因可溶性片段可在乳腺癌患者中检测 到,在乳腺癌早期诊断和随访复发性筛查中诊断价值等于甚至 优于 CA15-3<sup>[13]</sup>。Chen 等<sup>[14]</sup>将 Exo III 特异性识别降解双链 DNA 的平末端并从 3'-端切割释放 5'-单磷酸核苷酸产生单链 DNA 片段的特性,及水溶性硫磺素 T 特异性识别 G-quadruplex 四链结构产生极大荧光增强的特性巧妙结合起来,设计出 基于 Exo III 辅助的靶向循环、G-quadruplex 四链结构形成及硫 磺素介导荧光信号增强的检测 c-erbB-2 原癌基因的非标记生 物传感器。该荧光生物传感器线性检测范围为 100 fmol/L 到 1 pmol/L,检测限为 20 fmol/L。研究者采集经过病理确诊的 乳腺癌患者唾液样本,分别应用该生物传感器与 RT-PCR 进 行回收实验,回收率为 93.9%到 114.0%,表明该生物传感器 及其设计策略具备在临床早期非侵入性筛查乳腺癌的巨大 潜能。

1.2 电化学发光生物传感器 电化学发光是一种由电化学反 应引发的化学发光现象,具有高信噪比、无背景光信号、可控的 氧化还原反应、高灵敏度和选择性;常见的标记物有鲁米诺及 其衍生物、三联吡啶钌及其衍生物和其他金属螯合物<sup>[15]</sup>。Wu 等<sup>[16]</sup>成功构建基于反义 DNA 修饰的铟锡氧化物双极电极阳 极作为识别组分,二氧化硅纳米颗粒与 Ru(bpy)32<sup>+</sup> 复合物 [RuSi-Ru(bpy)32<sup>+</sup>]作为信号放大标签,检测乳腺癌 MCF-7 细胞原癌基因 c-Myc mRNA 的电化学发光生物传感器。将量 子点(CdSe-ZnS)与反义 DNA/报告 DNA 双链复合物经细胞 内吞途径转导入 MCF-7 细胞内,并与细胞内 c-Myc mRNA 结 合释放出报告 DNA;在高盐缓冲液环境下报告 DNA 与电极上 反义 DNA 结合形成的刚性棒状双链 DNA 结构使 RuSi-Ru (bpy)32<sup>+</sup>远离电极表面,从而通过电化学发光信号的衰减实 现 c-Myc mRNA 测定。该传感器线性检测范围为 2×10<sup>-16</sup> mol/L 到 1×10<sup>-11</sup> mol/L,可检测单个活细胞低至 13 个拷贝 的 c-Myc mRNA。Zhang 等[17] 将锁核苷酸(Locked nucleic acid,LNA)应用于立足点介导链置换反应(toehold-mediated strand displacement reaction, TMSDR)设计出用于检测乳腺癌 BRCA1 基因单核苷酸突变的电化学发光生物传感器。在无靶 序列存在时,传感器的金电极表面形成结合二茂铁的三元 Y 型交叉结构,抑制金电极表面的 Ru(bpy)32+ 纳米金复合物的 电化学发光反应,从而实现高灵敏度检测。该传感器的检测线 性范围为 10 fmol/L 到 0.8 pmol/L、检测限为 0.8 fmol/L,清

洗后重复测量信号强度仅降低 6.4%,放置 3 天后信号强度仅 降低 8.9%,具备良好的再生性和稳定性。量子点又称为半导 体纳米晶体,是由数百到数千个原子组成的无机纳米粒子; Ding 等<sup>[18]</sup> 发现半导体纳米晶体在一定的电位下可被氧化和还 原,并通过一定的湮灭反应导致相应的电化学发光过程,从而 将电化学发光技术和纳米技术有机结合起来。Jie 等<sup>[19]</sup>利用 一种具备磁性和电化学发光双功能的量子点复合材料 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/ CdSe,结合多重循环切口酶信号放大(Nicking enzyme signaling amplification, NESA)技术,成功构建出可检测肿瘤细胞靶 DNA 序列的电化学生物传感器。该生物传感器线性检测范围 300 cells/mL 到 9 000 cells/mL、检测限为 98 cells/mL,三次重 复测定 2 000 cells/mL 标本的相对标准偏差仅为 5.7%,显示 出良好的精密度和重现性。对加入临床样本基质中靶细胞的 准确测定显示出该传感器在临床早期筛查乳腺癌的巨大潜力。 1.3 表面等离子体共振传感器 表面等离子体共振(surface plasmon resonance. SPR) 是一种物理光学现象。平行表面的 偏振光以表面等离子体共振角入射在界面上,迫使导体表面自 由电子形成集体振动,当集体振动频率与偏振光频率一致时, 就形成表面等离子体共振<sup>[20]</sup>。SPR 生物传感器对于金属膜表 面固定的特异识别组分与被分析物结合过程中介质表面折射 率变化十分敏感,具有非标记、实时监测、准确快捷、无光漂白 和放射性污染等诸多优点<sup>[21]</sup>。Liu 等<sup>[22]</sup>发现通过测定玻璃基 片上有序排列的金纳米颗粒局部等离子共振效应的共振峰漂 移可以区分人视网膜色素上皮-1(Retinal pigment epithelial-1, RPE-1)细胞与乳腺癌 MCF-7 细胞并检测细胞浓度;直径 500 nm 的金纳米颗粒检测范围为 8.56×10<sup>3</sup>~1.09×10<sup>6</sup> cells/ mL;金纳米颗粒直径越大,检测范围越大,检测限越低。Li 等<sup>[23]</sup>首次成功构建基于 VentR(exo<sup>-</sup>) DNA 聚合酶特异性聚 合延长靶 DNA 序列检测乳腺癌 BRCA1 基因点突变的 SPR 生物传感器,检测线性范围为 100 pmol/L 到 250 n mol/L,线 性相关系数为 0.996 1。该生物传感器检测过程可在 15 min 内完成,经过30个循环检测清洗过程后信号衰减小于20%; 具备快速、高灵敏度筛查乳腺癌点突变的能力和良好的再 生性。

1.4 表面增强拉曼散射传感器 刘钰等<sup>[24]</sup>通过实验证实表 面增强拉曼散射(surface-enhanced Raman scattering,SERS)与 SPR之间存在着本质上的相关性,当 SPR系统对人射光的吸 收增加即反射减小时 SERS强度增大,在共振角附近的 SERS 强度是非共振处强度的 20 多倍。得益于窄带拉曼光谱信号和 宽激发波长,表面增强拉曼散射传感器只需单束激光激发即具 备多重检测复杂生物样本能力;但表面增强拉曼散射信号放大 仍存在诸多挑战<sup>[25]</sup>。Li等<sup>[25]</sup>成功构建了基于固定于三角形 纳米金阵列模式的捕获抗体-肿瘤标志物连接金纳米颗粒-拉 曼报告信号-二氧化硅夹心纳米颗粒的检测抗体形成三维立体 分层等离子纳米架构的生物传感器,通过增强的电磁场放大 SERS 信号用于检测临床乳腺癌患者样本中的血管内皮生长 因子,线性检测范围为 0.1 pg/mL 到 10 ng/mL、检测限为 7 fg/mL。

#### 2 电化学生物传感器

电化学生物传感器是基于待测物的电化学性质并将待测物化学量转变成电学量进行传感检测的一种传感器<sup>[26]</sup>,具备灵敏度高、成本低的优点。近年来,由指数级富集的配基系统进化技术筛选单链寡核苷酸片段的适配子技术及纳米技术在电化学生物传感器中得以广泛应用。Zhu等<sup>[27]</sup>成功构建基于适配体技术检测 MCF-7 细胞电化学生物传感器。该传感器通

过固定于电极上特异结合黏蛋白-1(MUC-1)适配体识别捕获 MCF-7 细胞和标记 HRP 的游离适配体放大信号,采用电化学 阻抗谱法检测线性范围为 100 cells/mL 到 1×107 cells/mL,操 作简便,成本低。Yan 等<sup>[28]</sup>以多孔氧化石墨烯/金复合物覆盖 的金电极为高效传感平面,吸附适配体的多孔铂铁合金放大信 号成功构建电化学适配体传感器。通过测定电化学阻抗谱、循 环伏安法和微分脉冲伏安法实现高灵敏度检测 MCF-7 细胞, 线性检测范围为 100 cells/mL 到 5.0×107 cells/mL、检测限为 38 cells/mL。同一电极五次独立重复测定标准偏差小于 5%, 干燥后4℃保存30天后信号强度仅减少10%,显示出良好的 重现性和稳定性。Patris 等<sup>[29]</sup>通过来源于骆驼抗体质量链抗 原结合片段的纳米抗体(Nanobodies, Nbs)与 HER2 胞外域在 丝网印刷电极上形成标记 HRP 的夹心复合物,成功构建检测 癌细胞溶解产物中 HER2 胞外域的生物传感器。该传感器采 用安培电流法,检测范围为1~200 μg/mL,整个检测过程两次 孵育过程分别仅需 2 min 和 20 min,方便快捷,价格低廉,适合 在临床推广使用。

### 3 质量型生物传感器

质量型生物传感器主要利用生物分子相互作用过程结合 或解离引起质量变化进行检测的传感器,具有简单快捷、非标 记、实时监测相互作用过程等优点。Zhang 等<sup>[30]</sup>成功构建基 于石英晶体微天平检测 MCF-7 细胞的生物传感器。该生物传 感器固定于表面的壳聚糖和叶酸偶联物可结合 MCF-7 细胞过 表达的叶酸受体,检测线性范围 4.5×10<sup>2</sup>~1.01×10<sup>5</sup> cells/ mL;通过溶菌酶可实现循环使用,具有非标记、易操作、准确的 优点。随着声光、微电子技术的发展,继陶瓷、半导体、光纤等 传感器后的后起之秀——漏声表面波(Leaky surface acoustic wave,LSAW)传感器逐渐发展起来。它利用压电晶体的特殊 切向(如:Y旋转 36°切割、X 方向传播的 LiTaO3 晶体)激励出 LSAW,当生物活性物质与待测物质发生反应即 LSAW 传播 路径表面质量负载发生微小改变时,导致 LSAW 传播频率和 相位发生相应的改变,通过换能器电信号的变化可实现检测。 LSAW 具有更高的相速度、更低的传输损耗,较其他传统瑞利 波机电耦合系数更大<sup>[31-32]</sup>,更适于液相检测。2014年 Chang 等<sup>[33]</sup>成功构建非标记、高灵敏度检测 MCF-7 细胞的 2×3 型 LSAW 适配体传感器微阵列。该传感器微阵列每个晶体谐振 器单元有独立的振荡回路避免相互干扰,特异结合 MUC-1 的 适配体固定于金电极表面的 LiTaO3 压电晶体上,线性检测范 围为1×10<sup>2</sup>~1×10<sup>7</sup> cells/mL、检测限为32 cells/mL;经过 EDTA 五次清洗重建后信号强度仍为原来的 90.9%,具有良 好的稳定性和重现性;六个单元可同时进行批量检测,其中一 个单元作为参比传感器,仅需 40 min 可完成全部测定,极具临 床推广应用价值。

## 4 展 望

当代检验医学发展呈现出基于大型高效仪器设备、自动 化、系列化检验的临床检验医学中心和基于便携手持装置的无 创或微创床旁检验(Point of care,POCT)的两种模式。随着微 加工技术和纳米技术的进步,生物传感器不断向微型化、集成 化方向发展,便携式测试仪已得到快速发展并应用于临床检 验。近年来相关专利研究证实抗 ATP6AP1 自身抗体独立用 于乳腺癌早期诊断的准确度达到 70%<sup>[34]</sup>。尽管血清和唾液中 自身抗体浓度存在差异<sup>[35]</sup>,但唾液仍可作为检测自身抗体的 一种介质,且健康者唾液中自身抗体浓度很低,可作为背景噪 声消除<sup>[36]</sup>。未来生物传感器应用于乳腺癌诊疗的趋势有:(1) 基于组织芯片、基因芯片、蛋白差异表达策略筛选出高诊断价 值的肿瘤标志物用于唾液等体液的非侵入性检测;(2)与流动 注射技术、色谱等其他分析技术联用构建应用于乳腺癌早期筛 查的高通量芯片实验室,准确快速检测临床复杂样本;(3)基于 微电子机械系统技术和纳米技术构建家用便携式生物传感器, 利用唾液等体液实现对乳腺癌等其他疾病的非侵入性快速筛 查和监测。

## 参考文献

- [1] 陈杰,李甘地.病理学[M].2版.北京:人民卫生出版社,2012: 373.
- [2] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90.
- [3] Xie YC, Yin T, Wiegraebe W, et al. Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging (vol 457, pg 97,2009)[J]. Nature,2010,466(7310):97-101.
- [4] Miller RG. Breast cancer screening: can we talk? [J]. J Gen Intern Med.2001,16(3):206-207.
- [5] Michaelson J, Satija S, Moore R, et al. Estimates of the sizes at which breast cancers become detectable on mammographic and on clinical grounds[J]. J Wom Imag, 2003, 5(1): 3-10.
- [6] Graham-Rowe D. Risk analysis: A dense issue[J]. Nature, 2012, 485(7400):60-61.
- [7] Lokate M, Peeters PH, Peelen LM, et al. Mammographic density and breast cancer risk: the role of the fat surrounding the fibroglandular tissue[J]. Breast Cancer Res, 2011, 13(5):103.
- [8] Ashbeck EL, Rosenberg RD, Stauber PM, et al. Benign breast biopsy diagnosis and subsequent risk of breast Cancer[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007, 16(3):467-472.
- [9] 张先恩. 生物传感器[M]. 北京:化学工业出版社, 2006.
- [10] Chung SY, Nam SW, Lim J, et al. A highly selective cyanide sensing in water via fluorescence change and its application to in vivo imaging[J]. Chem Commun (Camb),2009(20):2866-2868.
- [11] Padmanabhan S, Shinoj VK, Murukeshan VM, et al. Highly sensitive optical detection of specific protein in breast cancer cells using microstructured fiber in extremely low sample volume[J]. J Biomed Opt, 2010, 15(1):017005.
- [12] Lu S, Wang Y, Huang H, et al. Quantitative FRET imaging to visualize the invasiveness of live breast cancer cells [J]. PLoS One, 2013, 8(3):58569.
- [13] Streckfus C, Bigler L, Dellinger T, et al. The presence of soluble c-erbB-2 in saliva and serum among women with breast carcinoma: A preliminary study[J]. Clin Cancer Res, 2000,6(6):2363-2370.
- [14] Chen J, Lin J, Zhang X, et al. Label-free fluorescent biosensor based on the target recycling and Thioflavin T-induced quadruplex formation for short DNA species of c-erbB-2 detection[J]. Anal Chim Acta,2014,817(1):42-47.
- [15] Hu L, Xu G. Applications and trends in electrochemiluminescence[J]. Chem Soc Rev, 2010, 39(8): 3275-3304.
- [16] Wu MS, Qian GS, Xu JJ, et al. Sensitive electrochemiluminescence detection of c-Myc mRNA in breast Cancer cells on a wireless bipolar electrode[J]. Anal Chem, 2012, 84(12):5407-5414.
- [17] Zhang X, Zhang J, Wu DZ, et al. Ultraselective electrochemiluminescence biosensor based on locked nucleic acid modified toeholdmediated Strand displacement reaction and junction-probe [J]. Analyst, 2014, 139(23): 6109-6112.
- [18] Ding Z, Quinn BM, Haram SK, et al. Electrochemistry and electrogenerated chemiluminescence from Silicon nanocrystal quantum dots[J]. Science, 2002, 296(5571): 1293-1297.

- [19] Jie G, Zhao Y, Niu S. Amplified electrochemiluminescence detection of cancer cells using a new bifunctional quantum dot as signal probe[J]. Biosens Bioelectron, 2013, 50(4): 368-372.
- [20] 隋森芳,肖才德,杨军.表面等离体激元共振生物传感器[M].上 海:上海科学技术出版社,2008.
- [21] Wang J, Luo Y, Zhang B, et al. Rapid label-free identification of mixed bacterial infections by surface plasmon resonance [J]. J Transl Med, 2011, 9(1):85.
- [22] Liu F, Wong MM, Chiu SK2, et al. Effects of nanoparticle size and cell type on high sensitivity cell detection using a localized surface plasmon resonance biosensor [J]. Biosens Bioelectron, 2014, 55 (2):141-148.
- [23] Li Y, Yan Y, Lei Y, et al. Surface plasmon resonance biosensor for label-free and highly sensitive detection of point mutation using polymerization extension reaction[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 120(1):15-20.
- [24] 刘钰,徐抒平,唐彬,等.表面等离子体共振与表面增强拉曼散射 相关性研究[J].光散射学报,2010,22(1):29-33.
- [25] Li M, Cushing SK, Zhang JM, et al. Three-Dimensional hierarchical plasmonic Nano-Architecture enhanced Surface-Enhanced raman scattering immunosensor for Cancer biomarker detection in blood plasma[J]. ACS Nano, 2013, 7(6):4967-4976.
- [26] 姚守拙. 化学与生物传感器[M]. 北京:化学工业出版社,2006: 196.
- [27] Zhu X, Yang J, Liu M, et al. Sensitive detection of human breast Cancer cells based on aptamer-cell-aptamer sandwich architecture [J]. Anal Chim Acta, 2013, 764(1):59-63.
- [28] Yan M, Sun G, Liu F, et al. An aptasensor for sensitive detection of human breast Cancer cells by using porous GO/Au composites and porous PtFe alloy as effective sensing platform and signal amplification labels[J]. Anal Chim Acta, 2013, 798(1):33-39.
- [29] Patris S, De Pauw P, Vandeput M, et al. Nanoimmunoassay onto a screen printed electrode for HER2 breast Cancer biomarker determination[J]. Talanta, 2014, 130(2):164-170.
- [30] Zhang S, Bai H, Luo J, et al. A recyclable chitosan-based QCM biosensor for sensitive and selective detection of breast Cancer cells in real time[J]. Analyst,2014,139(23):6259-6265.
- [31] Meng L, Cai FY, Zhang ZD, et al. Transportation of single cell and microbubbles by phase-shift introduced to standing leaky surface acoustic waves [J]. Biomicrofluidics, 2011, 5 (4): 44104-4410410.
- [32] Rocha-Gaso MI, March-Iborra C, Montoya-Baides A, et al. Surface generated acoustic wave biosensors for the detection of pathogens: a review[J]. Sensors (Basel),2009,9(7):5740-5769.
- [33] Chang K, Pi Y, Lu WP, et al. Label-free and high-sensitive detection of human breast Cancer cells by aptamer-based leaky surface acoustic wave biosensor array[J]. Biosens Bioelectron, 2014, 60 (4):318-324.
- [34] Misek DE, Kim EH. Protein biomarkers for the early detection of breast cancer[J]. Int J Proteomics, 2011, 2011; 343582.
- [35] Ching KH, Burbelo PD, Gonzalez-Begne M, et al. Salivary anti-Ro60 and anti-Ro52 antibody profiles to diagnose sjogren's syndrome[J]. J Dent Res, 2011, 90(4):445-449.
- [36] Tiberti C, Shashaj B, Verrienti A, et al. GAD and IA-2 autoantibody detection in type 1 diabetic patient saliva[J]. Clin Immunol, 2009,131(2):271-276.