

(20 天) 内随疗程延长疗效增强, 但疗程超过此时间疗效无明显增强。故建议胞二磷胆碱治疗疗程可适当延长, 但不可盲目增加疗程, 否则不仅无益, 反而会增加患儿痛苦, 加重家长经济负担。(2) 胞二磷胆碱的治疗在一定时间窗内有效, 故治疗新生儿缺氧缺血性脑损伤时, 在强调基础治疗的同时, 应尽可能早的应用胞二磷胆碱干预治疗。本实验为临床治疗制定恰当方案提供动物实验依据, 其结果尚待临床实验进一步确定。

参 考 文 献

- 1 金汉珍, 黄德珉, 官希吉主编. 实用新生儿学. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 624.
- 2 “九五” 攻关项目 HIE 治疗协作组新生儿缺氧缺血性脑病治疗方案 (试行稿). 中国实用儿科杂志, 2000, 15 (6): 381 - 382.
- 3 新生儿缺氧缺血性脑病治疗协作组. 新生儿缺氧缺血性脑病多中心治疗的报告. 中国实用儿科杂志, 2000, 15 (6): 342 - 344.
- 4 新生儿缺氧缺血性脑病治疗协作组. 新生儿缺氧缺血性脑病第二次多中心治疗总结. 中国实用儿科杂志, 2003, 18 (9): 558 - 560.

(收稿: 2005 - 05 - 30)

光学蛋白质芯片检测乳腺癌 胸苷磷酸化酶的初步研究*

中国医学科学院/中国协和医科大学微循环研究所 (100005)

李爱玲 李宏伟 张 静 王战会¹ 孙 强² 靳 刚¹ 修瑞娟

摘 要 目的 应用我国自行研制的无标记光学蛋白质芯片检测乳腺癌组织中的胸苷磷酸化酶 (Thymidine phosphorylase, TP), 为建立一种快速、简便的临床检测方法进行初步探索。方法 将 TP 的多克隆抗体固定于已经过表面改性的固相光学硅片表面上制备无标记光学蛋白质芯片, 通过椭圆偏光显微成像技术检测 20 例经病理证实的乳腺浸润性导管癌组织标本和正常组织标本中 TP 水平, 以芯片灰度值表示组织中 TP 浓度高低。同时应用 ELISA 方法测定, 并比较两种方法检测结果的一致性。结果 20 例癌组织的灰度值 35.40 ± 11.55 , 20 例正常组织的灰度值为 26.80 ± 8.78 , 两组间差异具显著性意义 ($P < 0.05$)。以 44.36 (正常组织平均值 + 2 倍标准差) 为阈值, 乳腺癌检测的灵敏度为 20.00%, 特异度为 100.00%。同 ELISA 检测结果相比, 在 20 例乳腺癌组织标本检测中, 两种方法的一致性具极显著意义 ($P < 0.01$)。结论 我国首创的椭圆偏光显微成像技术简单、直观, 结合光学蛋白质芯片可用于胸苷磷酸化酶的临床检测。

关键词 椭圆偏光显微成像 胸苷磷酸化酶 光学蛋白质芯片

Initial Study on Thymidine Phosphorylase in Breast cancer Tissue by Optical Protein Chip. Li Ailing, Li Hongwei, Zhang Jing, et al. Institute of Microcirculation, Chinese Academy Medical Science (CAMS) & Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100005, China

Abstract Objective Unlabeled Optical Protein Chip (OPC) created in CAS (Chinese Academy of Science) was initially used to measure the level of thymidine phosphorylase (TP) in invasive ductal breast cancer in order to set up a fast and simple clinical method. Methods The level of TP in 20 cases of and 20 cases of healthy tissue verified by histology detection was measured using a kind of OPC on which anti-TP was fabricated on the surface of solid optical chip, then the result was showed directly by Imaging Ellipsometry system in gray way and compared with ELISA assay at the same time. Results The gray of TP in breast tissue was 35.40 ± 11.55 and 26.80 ± 8.78 in healthy tissue with a significant difference between them ($P < 0.05$). According to the cutoff gray 44.36 (mean + 2SD), the sensitivity of TP in breast cancer was 20.00% and speciality was 100.00%. And there is a significant concordance between OPC detection and ELISA assay ($P < 0.01$) among the 20 cases of cancer tissue. Conclusion The Imaging Ellipsometry method combining OPC is simple, fast and visual that might enable its good clinical feasibility in TP detection.

Key Words Imaging ellipsometry Thymidine phosphorylase Optical protein chip

* 中国科学院知识创新工程重大项目

1. 中国科学院力学研究所 (100080); 2. 北京协和医院 (100730)

胸苷磷酸化酶 (TP), 又称血小板源性内皮细胞生长因子, 是一种酶性促血管新生因子。经多因素分析, 多数研究认为 TP 是乳腺癌总生存率的独立预后因素, 在高增殖活性和高浸润潜能的乳癌中表达活性较高。而且是临床新型抗肿瘤药 Xeloda (5-FU 的第三代药物) 的前药酶。以往的研究发现, TP 高表达的乳腺癌患者应用 CMF 方案化疗的疗效明显高于 TP 低表达者^[1]。所以对 TP 在乳腺癌的浓度进行准确、快速的检测是非常必要的, 对于临床预后判断、采用合理治疗方案意义重大。

本文介绍一种由我国靳刚教授^[2,3]创立的新型的研究方法——无标记的光学蛋白质芯片技术对乳腺癌中血管新生因子 TP 进行研究, 为建立一种快速、简便的临床检测方法进行初步探索。该技术以无标记椭圆偏光学生物传感器为检测技术, 利用具有微型全分析系统中的微流控芯片和微阵列芯片两者优势的微流道蛋白质芯片作为反应器进行反应, 通过具有高空间分辨率的非接触型椭圆偏光显微成像系统进行检测。该方法不需要对研究样品作任何标记, 避免了由标记方法带来的种种问题。测定周期短, 试验操作简单。结果可以图像形式显示, 直观且可进行定性、定量测定。而且能够高重复性地制备蛋白质芯片, 可以作为高效率的微型芯片反应器^[4]。

材料与方法

1. 材料

(1) 研究样品: 北京协和医院乳腺中心提供、经组织病理证实为浸润性导管癌组织及周围正常组织, 取 300g 乳腺组织, 进行匀浆后经 Tris-HCl (pH 7.4) 的缓冲液悬浮, 100, 000g 4℃离心, 取上清液为待测样品;

(2) 生物试剂: 光学抛光硅片由中国科学院力学研究所提供、经二氯二甲基硅烷处理。胸苷磷酸化酶多克隆抗体 (anti-TP, R&D), TP 检测 ELISA 试剂盒由 Roche 公司提供。

(3) 光学蛋白质芯片的装配、反应和检测: 具有生物活性的生物分子, 装配于经过表面改性的固相光学抛光硅片表面上, 形成生物活性感应膜层即生物活性探针。把感应表面的一部分插入到含有生物分子的溶液中, 如果溶液中的生物分子与芯片上的生物分子之间存在特异性结合的话, 就会在芯片上形成复合分子膜层。反应结束后, 将生物活性探针固定在椭圆偏光显微成像系统样品台上, 可以高分辨率地观察到基片上膜层厚度的变化, 从而判断溶液中是否含有能够与感应表面上的生物分子发生特异性结合的生物分子。溶液中生物分子的浓度越高, 如抗原-抗体特异性结合的复合物膜层厚度就会显著增加。

(4) 椭圆偏光显微成像技术的原理: 椭圆偏光显微成像

技术是近几年发展起来的一项用于超薄膜检测的技术。该技术的特点是厚度分辨率极高, 能够达到 0.1nm。研究表明绝大部分蛋白质在固体表面上形成的单分子饱和吸附膜层几何厚度在 2~10nm 的范围内, 膜层是薄而透明的, 在物理上, 属于超薄相位体。由于相位体不引起探测光波的幅值变化, 即使用显微镜也难以观测。而椭圆偏光显微成像技术厚度高分辨率的特点能够观测如此薄的膜层。椭圆偏光显微成像技术是用偏振光波为探测光照射样品, 样品会对入射光波进行调制使得反射光中载有样品的信息, 成像以灰度数字图像形式记录检测结果。在基底消光条件下, 基片表面的生物分子膜层的厚度 (或分子面密度) 同反射光强的平方根成正比。光强用灰度值表示, 膜层的厚度 (或分子面密度) 愈大, 灰度值愈高^[3]。

2. 方法: 本实验采用微流道加样技术, 在处理过的硅片疏水表面上滴加 anti-TP (0.1mg/ml), 流速 0.1μL/s, 时间 30min, 以达到蛋白分子在表面饱和和吸附的程度, 形成单分子膜层, 即 Anti-TP 感应表面。然后, 用去离子水冲洗硅片表面, 清除掉没有被装配到表面上的生物分子, 再用氮气吹干。把 anti-TP 分子膜层浸泡在 2% BSA 中 30min, 封闭表面。然后将其浸泡到待测的研究样品中 30min, 用去离子水冲洗干净, 氮气吹干, 然后通过椭圆偏光显微成像系统进行检测。同时应用 TP 的 ELISA 检测试剂盒说明, 对同一批研究样品进行 ELISA 检测。各组数据以平均数 ± 标准差表示, 进行 *t* 检验; 对蛋白质芯片法及 ELISA 两种方法的检测结果进行非参数统计, 以 $P < 0.05$ 为具有显著性意义。

结 果

椭圆偏光显微成像检测系统是通过直接检测芯片表面上生物分子膜层的厚度来确定生物分子在表面上的结合量 (即分子面密度), 分子膜层厚度越大, 所结合的生物分子越多, 代策样品中的生物分子浓度越高。通过检测, 可以看到样品中 TP 分子与硅片表面的活性感应分子 - anti-TP 结合形成复合分子, 表现为硅片灰度变大 (亮度增加), 分子面密度增加 (复合分子膜层厚度增加); TP 浓度越高, 灰度越大, 分子面密度越大 (图 1、图 2)。

在经病理证实为浸润性导管癌的 20 例癌组织中, TP 的灰度值平均为 35.4 ± 11.55 , 20 例正常组织的灰度值为 26.8 ± 8.78 , 两组间差异具显著性意义 ($P < 0.05$)。以 44.36 (正常组织平均值 + 2 倍标准差) 为阈值, 发现乳腺癌检测的灵敏度为 20.0%, 特异度为 100.0% 同时, 我们应用 ELISA 进行同一样品检测。癌组织 TP 平均浓度 141.67 ± 59.58 ng/mg。正常组织 TP 平均浓度为 14.24 ± 12.45 ng/mg。以 39.14 (正常组织平均值 + 2 倍标准差) 为阈值, 乳腺癌检测的灵敏度达 98.0%, 特异

性 98.0%。经非参数统计的一致性检验，两种方法的一致性较好 ($Kappa = 0.6858$, $U = 2.03 > U_{0.01}$, $P < 0.01$)。

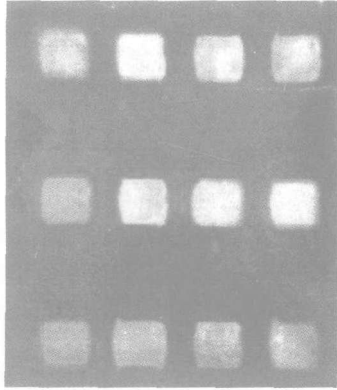


图1 样品中 TP 浓度越高，芯片灰度（亮度）越大

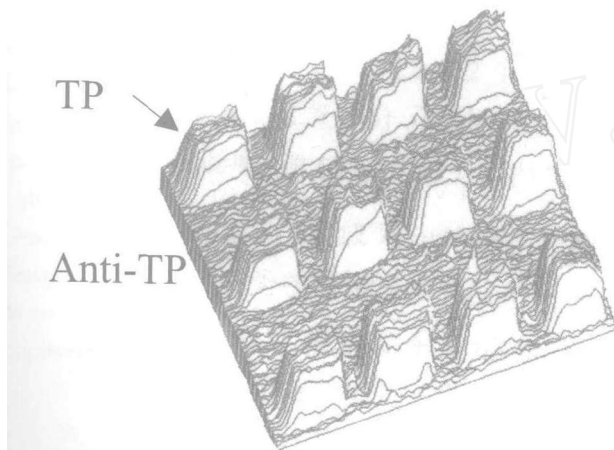


图2 芯片上的 TP 分子面密度（膜层厚度）随样品中 TP 浓度的增高而增加

讨 论

目前关于 TP 的检测，在国内尚未见相关的报道，但在国际上研究较多。主要的研究方法有三种：免疫组化 (IHC)、ELISA 和 RT-PCR^[1]。IHC 研究历史最长、是 TP 发现以来研究应用最多的方法，但受到调研者工作经验、主观判断性及取材的限制；由于缺乏统一的评定标准，造成了 TP 与乳腺癌血管新生关系及其在乳腺癌预后判断中的争议，而且不能对 TP 进行定量分析，正逐渐被近 10 年发展起来的 ELISA 所取代。ELISA 是 TP 检测中敏感性最强、且能够对 TP 进行定量测定的方法，可以对组织和血清中的 TP 进行检测。日本 Roche 公司已经推出了标

准化的 TP-ELISA 试剂盒，其临床检测使用正在推广中。至于 RT-PCR 方法则由于对样本处理和实验室要求较高，应用较少。但值得注意的是，ELISA 虽然可以对 TP 进行定量测定，但需要对样品进行标记，可能会对样品的生物活性造成损伤；而且过程复杂，价格昂贵。

1. 本次试验中，我们采用了微流道加样技术制备生物活性探针，装配蛋白质芯片，保证了样品的生物反应膜层的均一度，提高了检测效率并降低了试剂消耗。在实验中，仅仅使用了 10 μ l 的检测样品，花费 2 小时就检测完了所有的样品，操作过程简便。通过我们的实验结果可以看到，在一个 12 单元芯片上，同时检测 12 个样品，形成的分析分子复合膜层厚度、灰度随待测样品中 TP 浓度而改变。分子膜层厚度越大，表明 TP 分子浓度越高。灰度值越大，芯片亮度越大，表明 TP 的浓度越大，结果非常直观。

2. 临床指标检测技术发展非常快，电化学发光法已经成为一种检测灵敏度最高的方法，广泛应用于如 CA15-3, AFP 等指标的检测并成为检测的金标准。但对于 TP 的检测，ELISA 仍是目前 TP 检测中敏感性最强、且能够对 TP 进行定量测定的方法。所以，我们在应用光学芯片进行 TP 检测的同时，应用 ELISA 方法对同一批研究样品进行检测，并比较了两者检测结果的一致性。我们发现，尽管芯片检测法的灵敏度率低于 ELISA，但从二者的一致性比较中可以看出，二者检测结果的一致性较好。芯片法检测结果的灵敏度较低，估计其中原因可能与实验中蛋白质芯片的制备有关。应用 TP-多克隆抗体制备蛋白质芯片，造成正常组织检测值偏高，阳性阈值制定过高，从而导致乳腺癌检出的灵敏度降低。如果应用特异性的单克隆抗体，相信会有所提高。同时，需要指出的是，本实验仅仅是对蛋白质光学芯片检测乳腺癌组织中 TP 的初步探讨，样本量亦较少，尚需大样本的试验进行验证。

3. 通过实验结果，我们认为，我国首创的椭圆光学显微成像技术简单、直观，可以随时对少量样品进行检测，不需要对所研究的生物分子做标记，从而保证了样品的活性，结合良好的光学蛋白质芯片可用于胸苷磷酸化酶的临床检测。目前中科院力学所已经完成了微流道蛋白质芯片系统样机的组装和蛋白质芯片反应膜块，我所建立了光学芯片检测实验室并投入使用。 (下转第 28 页)

在 SARS 传播过程中,常常会出现超级传播现象。这个过程一般会使 20 名以上的健康人受到感染。新加坡的 5 个超级传播事件一共感染了 122 人^[3]。北京出现过 1 个超级传播事件,其传播链中有 4 个超级传播事件,共感染 77 人。与首代病例有过密切接触的 75 人中有 44% 发病,在其第 2 代患者的 98 名密切接触者中有 31.6% 发病,在第 3 代的 54 名密切接触者中仅有 1 人发病。结果显示,超级传播者的密切接触者中续发率为 43.2%,普通传播者的密切接触者中续发率为 18.5%。超级传播链中的超级传播者往往病情危重,甚至死亡。通过对 2004 年北京 SARS 流行传播链的分析,认为 SARS 传播过程再次显示具有“充电现象”,即 SARS 在传播过程中呈现突然增强,然后急速减弱的现象。在本次 SARS 流行中,1 名第一代病例传染 2 例,而 1 名第 2 代病例却传染了 5 例,该二代病例表现出很强的传染性。在三代 SARS 病例中,5 名第 3 代病例的传染性均未能表现出来。这既可能与及时采取的个人防护和隔离等措施有密切关系,也可能受到传染力减弱的影响。“充电现象”发生的原因可能是病毒侵入机体和更迭宿主的过程中发生了毒力变异,或由于个体差异使病毒的致病力和传染性增强,也可能

(上接第 21 页)

应用前景

随着生物医学的发展,多指标并行检测愈来愈成为生物学研究、医学检测领域的迫切需求。对于临床疾病如心脑血管病和肿瘤的诊断、治疗和随访都依赖于多种生化指标的联合检测,临床医生往往需要对病人的多项指标进行综合考虑才能作出诊断结论。而且,由于不同单位采用的设备和试剂不同、检测人员的素质差别大等原因,检查结果不能得到其他机构的认同,不但增加患者的经济负担,而且可能因此而延误治疗。光学蛋白质芯片可以重复使用,成批量生产,成本低廉,克服以上缺点既方便快捷、费用低廉,又可统一标准、利于沟通。因此如能开发出临床应用型的光学蛋白质芯片及检测设备,那么对于提高常见疾病的临床诊治水平、改善患者的预后和降低医疗开支会有巨大的促进作用。

血管新生或药物作用都是一个复杂和动态的过程,在血管新生中,许多生长因子分别参与血管新生的各个环节,不同分子间质或量的变化及其相互作用,都会影响微血管的形态及其生理功能。只是检测某一时点上的肿瘤血管新生因子状态而缺乏血管因子作用的功能性信息,对诠释血管新生发病机制及药物作用过程很是不够。光学蛋白质芯片不仅能够大面积精确显示超薄膜的厚度分布,而且能够用于表面实

由于宿主体免疫特性等原因导致其获得感染后,病毒在体内大量复制并排除体外,易于扩散和传播。

与 2003 年 SARS 流行情况比较,2004 年北京 SARS 流行在感染途径和流行特征方面基本相似,但其传播过程及病例诊断等方面有些不同。比较突出的特点是,2004 年北京发现的全部 SARS 续发病例均有明确的密切接触史,血清抗体检测均呈阳性。诊断标准的掌握已向传染病诊断的共性靠拢,血清抗体检测成为确诊的最重要依据,基本上排除了以往存在的受主观判断和意向性诊断的影响。因此,对 2004 年北京 SARS 流行情况的分析,既是对过去 SARS 流行机制研究结论的验证,也是对 SARS 传播及传染力认识的补充。

参考文献

- 1 刘民,梁万年,杜红等.2003 年北京市城区和郊县 SARS 流行情况分析.中国公共卫生,2004,20(2):136-137.
- 2 卫生部、国家中医药局修订并下发新的《传染性非典型肺炎(SARS)诊疗方案》.防治简报,第 75 期,2003-10-21 日.
- 3 梁万年,黄若刚,赵锐等.SARS 病毒及其流行特征,中国全科医学,2003,6(7):42-44.
- 4 李敬云,鲍作义,刘思扬等.传染性非典型肺炎患者排泄物中 SARS 病毒生存和抵抗能力的研究,中华流行病学杂志,2003,24(7):633.

(收稿:2005-07-01)

时吸附的动力学研究,获得生物分子反应的功能性信息,为上述研究带来了希望。

在本次研究中,所用的蛋白质芯片微单元面积较大($0.75 \times 0.75 \text{mm}^2$),数量有限,而实际上可以通过降低微单元的面积来提高单位面积上的微单元数目,椭圆光学显微成像系统的横向分辨率能够达到微米量级,所以微单元面积的下降余地很大。在最近的研究中,我们正在使用的是 48 单元的蛋白质芯片。而且,本次试验用的是手动加样枪,在通量较高时可以使用自动机械手来进行加样,从而节省时间,增加检测的通量。所以,光学蛋白质芯片有着巨大的发展和应用潜力(致谢:本研究受到中国科学院知识创新工程重大项目的资助,谨此致谢)。

参考文献

- 1 Yang QF, et al. Thymidine phosphorylase and breast carcinoma [J]. *Anti-cancer Research*, 2002, 22: 2355-2360.
- 2 靳刚,孟永宏,邢建华等.生物分子吸附膜层的图像显示[J]. *测试技术学报*, 1998, 12(3): 166-170.
- 3 王战会,靳刚.光学椭圆成像技术在生物分子研究中的应用[J]. *生物工程学报*, 2000, 16(4): 429-43.
- 4 王战会,靳刚.光学蛋白质芯片关键技术研究及生物医学应用.中国科学院力学研究所.2005(年博士学位论文).P49-55.

(收稿:2005-07-01)