

光学蛋白质芯片检测乳腺癌组织中胸苷磷酸化酶的临床初探

李爱玲, 李宏伟, 张静, 王战会, 孙强, 靳刚, 修瑞娟

【摘要】目的 应用我国自行研制的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** 应用 TP 的多克隆抗体制备光学蛋白质芯片, 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的 TP 水平, 以灰度值表示组织中 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

中图分类号: R655.8 文献标识码: A

Initial Study on Thymidine Phosphorylase in Breast Cancer Tissue by Optical Protein Chip

LI Ai-ling, LI Hong-wei, ZHANG Jing, et al. Institute of Microcirculation, Chinese Academy of Medical Science (CAMS) & Peking Union Medical College (PUMC), Beijing, 100005, China

【Abstract】Objective 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 cancer tissue and 20 cases of healthy tissue verified by histology detection was measured using a kind of OPC on which anti-TP was fixed, then the result was shown 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. **Conclusions** The imaging ellipsometry method combining with 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

胸苷磷酸化酶 (thymidine phosphorylase, 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^[1,2]。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^[3]; 而且是临床新型抗肿瘤药 Xeloda (5-FU 的第三代药物) 的前药酶^[4]; 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^[5]。

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。

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^[5-7]。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

基金项目: 中国科学院知识创新工程重大项目

作者单位: 100005 北京, 中国医学科学院中国协和医科大学微循环研究所 (李爱玲, 李宏伟, 张静, 修瑞娟); 北京协和医院 (孙强); 中国科学院力学研究所 (王战会, 靳刚)

第一作者简介: 李爱玲 (1970-), 女, 汉族, 讲师。主要从事肿瘤血管新生的研究。

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,目前正在推广的 ELISA 方法,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。

本文介绍一种由我国靳刚教授^[8,9]创立的新型的研究方法—光学蛋白质芯片技术。该技术基于光学椭圆偏显微成像原理,将高分辨率的生物光学显微成像技术和集成化多元蛋白质生物芯片技术相结合,结果可以图像形式显示,直观且可进行定性、定量测定。该方法不需要对研究样品作任何标记,测定周期短,试验操作简单。因此,本研究将应用新型的、无需标记的光学蛋白质芯片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。

材料与方 法

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(其中 Ⅰ期 3 例,Ⅱ期 14 例,Ⅲ期 3 例,均无远处转移)及周围正常组织,取 300 g 乳腺组织,进行匀浆后经 Tris-HCl(pH 7.4)的缓冲液悬浮,100 000 g 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 检测的 ELISA 试剂盒由 Roche 公司提供。

3 椭圆偏光学显微成像技术的原理

椭圆偏光学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 0.1 nm。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和吸附膜层几何厚度在 2~10 nm 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。而椭圆偏光学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。椭圆偏光学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。在基底消光条件下,基片表面的生物分子膜层的厚度(或表面密度)

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(或表面密度)愈大,灰度值愈高。

4 光学蛋白质芯片

光学蛋白质芯片就是将具有生物活性的生物分子,装配于固相光学抛光硅片表面上,形成单分子膜层,即感应表面。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。与溶液接触的部分膜层,如抗原-抗体特异性结合的复合物膜层,厚度就会显著增加。通过椭圆偏光学显微成像技术可以高分辨率地观察到基片上膜层厚度的变化,从而可以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。

5 检测过程

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(0.1 mg/ml),流速 0.1 μl/s,时间 30 min,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 30 min,封闭表面。然后将其浸泡到待测的研究样品中 30 min,用去离子水冲洗干净,氮气吹干。然后通过椭圆偏光学显微成像系统进行检测(图 1)。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。

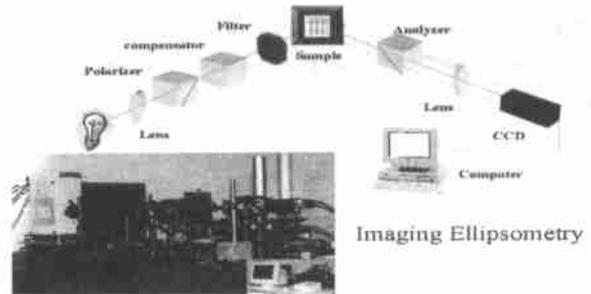


图 1 椭圆偏光学显微成像技术检测系统示意图

6 数据处理: 各组数据以均数 ±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

通过椭圆偏光学显微成像检测系统,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 2, 3)。

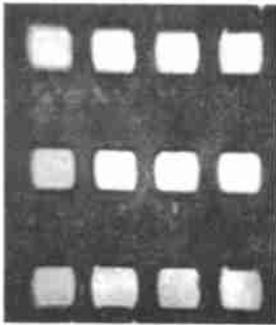


图 2 样品中 TP 浓度越高,芯片灰度(亮度)越大

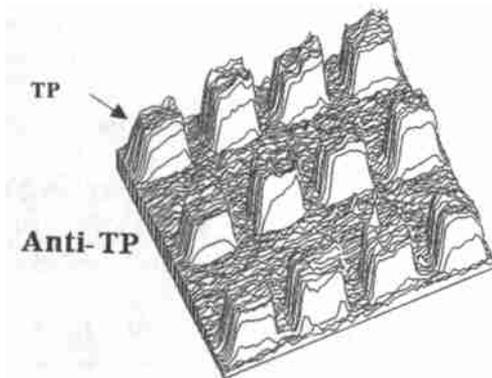


图 3 芯片上的 TP 分子面密度
(膜层厚度)随样品中 TP 浓度的增高而增加

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 ($Kappa = 0.6858, U = 2.03 > U_{0.01}, P < 0.01$)。

讨论

光学芯片技术已广泛用于蛋白质分子的检测, 目前国际报道较多方法基于表面等离子体共振原理^[10-12]。我们采用的光学芯片技术原理是光学椭偏显微成像技术, 不仅可以观察分子间的相互作用, 而且基于其表面显示技术可以直观地观察生物分子与固体表面吸附以及生物分子之间相互作用^[9, 13]。

在实验中, 仅仅使用了 $10 \mu\text{l}$ 的检测样品, 花费

2 个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, 形成的分析分子面密度、灰度随待测样品中 TP 浓度而改变。分子面密度越大, 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。

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, 但从两者的一致性比较中可以看出, 两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。

通过实验结果, 我们认为, 我国首创的椭偏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。

应用前景

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^[14]。只是检测某一时间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理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 (分子面密度分布), 而且能够用于表面实时吸附的动力学研究, 获得生物分子反应的功能性信息, 与目前国际报道较多的光学芯片技术 - 生物分子相互作用分析 (BIA) 一起为上述研究带来了希望^[12]。

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, 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

查结果不能得到其它机构的认同,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。

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 Haraguchi M, Kazutaka M, Uemura K, et al. Angiogenic activity of enzymes[J]. Nature. 1994, 368:198
- 2 Finnis C, Dodsworth N, Politt CE, et al. Thymidine phosphorylase activity of platelet - derived endothelial cell growth factor is responsible for endothelial cell mitogenicity[J]. Eur J Biochem. 1993, 212: 201 ~ 210
- 3 Yang QF, Barbareschi m, Mbr I, et al. Prognostic value of thymidine phosphorylase expression in breast carcinoma[J]. Int J Cancer. 2002, 97: 512 ~ 517
- 4 Blum JL. The role of capecitabine, an oral, enzymatically activated fluoropyrimidine, in the treatment of metastatic breast cancer[J]. Oncologist. 2001, 6: 56 ~ 64
- 5 Yang QF, Yoshimura G, Mbr I, et al. Thymidine phosphorylase and

- breast carcinoma[J]. Anticancer Research. 2002, 22: 2355 ~ 2360
- 6 Kurosumi M, Sugamata N, Tabei T, et al. Comparison of ELISA level and immunohistochemical status for thymidine phosphorylase (TP) in invasive breast carcinoma[J]. Anticancer Res. 2002, 22: 331 ~ 333
- 7 Ogura O, Kanzaki A, Bando H, et al. Expression of thymidylate synthase and thymidine phosphorylase in human breast carcinoma: implication for method to detect expression of these molecules in clinic[J]. Cancer Lett. 2003, 190(1):97 ~ 104
- 8 靳刚,孟永宏,邢建华,等. 生物分子吸附膜层的图象显示[J]. 测试技术学报. 1998, 12(3): 166 ~ 170
- 9 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 ~ 443
- 10 Lopez F, Pichereaux C, Bulet - Schiltz O, et al. Improved sensitivity of biomolecular interaction analysis mass spectrometry for the identification of interacting molecules[J]. Proteomics. 2003, 3:402 ~ 412
- 11 Schneider BH, Dickinson EL, Vach MD, et al. Optical chip immunoassay for hCG in human whole blood[J]. Biosens Bioelectron. 2000, 15: 597 ~ 604
- 12 Rasooly A. Surface plasmon resonance analysis of staphylococcal enterotoxin B in food[J]. J Food Prot. 2001, 64: 37 ~ 43
- 13 王战会,靳刚. 应用椭圆光学显微成像对 IL - 6 与其受体的相互作用的初步观察[J]. 生物工程学报. 2002, 18(1): 99 ~ 101
- 14 修瑞娟. 微血管医学与蛋白质组学[J]. 中国微循环. 2004, 8(2): 69 ~ 71

(收稿:2003 - 12 - 31 修回:2004 - 03 - 05)

(上接第 239 页)

3 心律失常的情况:术中出现室性心律失常和房室传导阻滞的情况试验组与对照组有显著性差异(见表 3)。

4 不良事件:两组均无严重的不良事件。

表 3 两组结果比较

比较项目	试验组	对照组	P值
心电图			
平均ST段抬高或降低	1.32 mm	2.88 mm	0.01
最大ST段抬高或降低	2.55 mm	4.68 mm	0.02
充气到ST段抬高或降低时间	23.8 s	15.6 s	0.05
T波改变的幅度	2.76 mm	5.43 mm	0.01
心绞痛			
充气到发生心绞痛的平均时间	35.5 s	19.5 s	0.01
充气到心绞痛缓解的平均时间	10.3 s	21.4 s	0.01
心律失常			
室性心律失常	2	6	0.001
房室传导阻滞(二度以上)	1	5	0.001

讨 论

缺血性心脏病的病理变化与机体的代谢和功能异常有关^[1]。PTCA术中的球囊充气可引起心肌一过性缺血,心肌电活动和传导系统的紊乱,进而影响正常的血流动力学。当心肌缺血时,表现为心绞痛和心电图的变化。因为在 PTCA 过程中难以避免这种情况,故控制缺血对机体的不良影响至关重要^[2]。应用曲美他嗪就是方法之一。曲美他嗪的药理作用是:保护心肌细胞结构和功能,在一过性心肌缺血停

止后重建心肌细胞的正常功能,减少心肌细胞坏死。其作用在动物实验中和临床试验中均得到了证实。曲美他嗪单独应用或与钙拮抗剂,受体阻滞剂联合应用同样有效。曲美他嗪可以增加冠脉储备,减低心绞痛严重程度和增加患者的耐受性。心肌缺血时,细胞跨膜离子转运功能受阻,导致钠离子在细胞内的聚集和钾离子在细胞外的聚集,引起 ST 段抬高。ST 段抬高的幅度与冠脉血流受阻程度成正相关。同样, T 波改变由心内膜复极延迟造成的,引起心内膜复极延迟的原因是心肌缺血。应用曲美他嗪患者心电图异常较少,且在 PTCA 术中心电生理较稳定。这与其他试验结果一致。

曲美他嗪是一种影响代谢的药物,在 PTCA 术前应用可以减少术中心肌缺血引起的不良后果。因其具有心肌细胞保护作用,故可改善心绞痛症状,加速心肌功能的恢复。

参 考 文 献

- 1 何作云. 抗血小板和抗凝血药物在冠心病领域的研究进展 [J]. 中国微循环. 2002, 6(4): 197 ~ 200
- 2 骆秉铨,李占全,王人彭,等. PTCA 治疗急性心肌梗死中无复流现象的临床研究[J]. 中国微循环. 1999, 3(4): 259

(收稿:2003 - 09 - 12 修回:2004 - 05 - 21)

