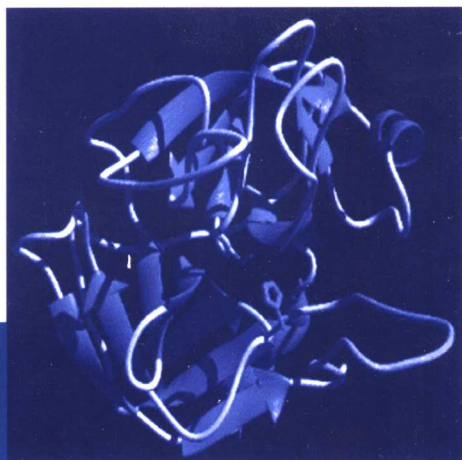


肿瘤标志

临床应用与研究进展

Clinical Application and Advances of Tumor Markers

万文徽 主编



北京大学医学出版社

肿瘤标志

临床应用与研究进展

主 编 万文徽

编 委 (姓名以作者文章先后为序)

万文徽	李振甫	许佐良	康熙雄	王北宁	李金明
杨振华	纪小龙	何洛文	柯 杨	邓国仁	李志刚
李春海	冯久贤	王申五	章静波	刘叙仪	郭尧君
彭嘉柔	季加孚	黄 飏	毛建军	刘国詮	范振符

北京大学医学出版社

ZHONGLIU BIAOZHI LINCHUANG YINGYONG YU YANJIU JINZHAN

图书在版编目 (CIP) 数据

肿瘤标志临床应用与研究进展/万文徽主编. —北京:
北京大学医学出版社, 2005. 7

ISBN 7-81071-833-9

I. 肿... II. 万... III. 肿瘤—实验室诊断—研究
IV. R730.43

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 055516 号

肿瘤标志临床应用与研究进展

主 编: 万文徽

出版发行: 北京大学医学出版社 (电话: 010-82802230)

地 址: (100083) 北京市海淀区学院路 38 号 北京大学医学部院内

网 址: <http://www.pumpress.com.cn>

E-mail: booksale@bjmu.edu.cn

印 刷: 北京地泰德印刷有限公司

经 销: 新华书店

责任编辑: 王凤廷 王丽华 姜艾琳 责任校对: 蓝叶 责任印制: 郭桂兰

开 本: 787mm×1092mm 1/16 印张: 27.5 字数: 693 千字

版 次: 2005 年 8 月第 1 版 2005 年 8 月第 1 次印刷 印数: 1—3000 册

书 号: ISBN 7-81071-833-9/R·833

定 价: 62.80 元

版权所有, 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

《肿瘤标志临床应用与研究进展》参加编写人员

(姓名以作者文章先后为序)

- 万文徽 北京大学临床肿瘤学院 北京市肿瘤防治研究所 北京肿瘤医院 研究员
李振甫 北京大学临床肿瘤学院 北京市肿瘤防治研究所 北京肿瘤医院 副研究员
许佐良 北京大学临床肿瘤学院 北京市肿瘤防治研究所 北京肿瘤医院 教授
刘 波 北京大学临床肿瘤学院 北京市肿瘤防治研究所 北京肿瘤医院 硕士
王 琼 北京大学临床肿瘤学院 北京市肿瘤防治研究所 北京肿瘤医院 主治医师
王国洪 北京大学临床肿瘤学院 北京市肿瘤防治研究所 北京肿瘤医院 副主任医师
杨航燕 空军总医院核医学科 主治医师
高 晨 拜耳医药保健有限公司 硕士
孙 巍 北京大学临床肿瘤学院 北京市肿瘤防治研究所 北京肿瘤医院 副主任医师
朱 军 北京大学临床肿瘤学院 北京市肿瘤防治研究所 北京肿瘤医院 副主任医师
王德林 北京大学临床肿瘤学院 北京市肿瘤防治研究所 北京肿瘤医院 主治医师
方 芳 首都医科大学北京天坛医院 住院医师
王雅杰 首都医科大学北京天坛医院 住院医师
康熙雄 首都医科大学北京天坛医院 教授
陈 燕 福建省肿瘤医院 主任医师
余 靖 北京大学临床肿瘤学院 北京市肿瘤防治研究所 北京肿瘤医院 博士
王北宁 北京军区总医院 教授
李金明 卫生部临床检验中心 研究员
杨振华 卫生部临床检验中心 教授
纪小龙 武警总医院 教授
何洛文 北京大学临床肿瘤学院 北京市肿瘤防治研究所 北京肿瘤医院 研究员
屈晨雪 北京大学第一医院 主治医师
柯 杨 北京大学临床肿瘤学院 北京市肿瘤防治研究所 北京肿瘤医院 教授
李 勇 北京大学临床肿瘤学院 北京市肿瘤防治研究所 北京肿瘤医院 博士
邓国仁 北京大学临床肿瘤学院 北京市肿瘤防治研究所 北京肿瘤医院 教授
李志刚 北京儿童医院血液病中心 助理研究员
李春海 军事医学科学院 教授
冯久贤 上海胸科医院 上海胸部肿瘤研究所 主任医师
- 王申五** 北京大学人民医院 教授
- 李志琴 中国医学科学院基础医学研究所 博士
章静波 中国医学科学院基础医学研究所 教授
王 湛 中国医学科学院基础医学研究所 博士
王 清 北京大学临床肿瘤学院 北京市肿瘤防治研究所 北京肿瘤医院 硕士
刘叙仪 北京大学临床肿瘤学院 北京市肿瘤防治研究所 北京肿瘤医院 教授
王 玉 北京大学临床肿瘤学院 北京市肿瘤防治研究所 北京肿瘤医院 硕士

张 洁 北京大学第三医院 主任医师
郭尧君 中国科学院生物物理研究所 研究员
王 锋 中国科学院生物物理研究所 博士
彭嘉柔 北京大学医药卫生分析中心蛋白质组学实验室 研究员
季加孚 北京大学临床肿瘤学院 北京市肿瘤防治研究所 北京肿瘤医院 教授
袁志宏 北京大学医学部基础医学院 博士
步召德 北京大学临床肿瘤学院 北京市肿瘤防治研究所 北京肿瘤医院 博士
齐 军 中国医学科学院肿瘤医院 主任医师
郑卫东 广东省人民医院 硕士
黄 飏 江苏省原子医学研究所 副研究员
毛建军 中国科学院化学研究所 副研究员
刘国詮 中国科学院化学研究所 研究员
何方洋 北京望尔生物技术有限公司 博士
陈智周 中国医学科学院肿瘤医院 教授
范飞舟 北京百澳东方生物传感技术有限公司 博士
范振符 中国医学科学院肿瘤医院 教授
吴 健 北京大学临床肿瘤学院 北京市肿瘤防治研究所 北京肿瘤医院 主管技师
杨江颖 北京大学临床肿瘤学院 北京市肿瘤防治研究所 北京肿瘤医院 主管检验师

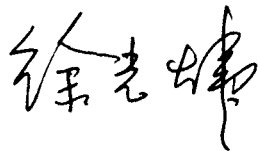
序一

记得 20 世纪 60 年代,我刚投身于肿瘤事业时,鉴于 α FP、CEA 相继被发现,当时曾有“一滴血、一泡尿”攻克癌症早期诊断的豪迈目标。一时群起而“攻”之,各有关实验室几乎均在血、体液及排泄物中研究,探索有助于癌症诊断的各种指标,甚至组织现场大会战等。当然,这种在对于癌的发生机理尚缺乏认识的背景下,又采取群众运动的形式,只能以失败而告终。但是人们的这一良好愿望并未随之消失。

近 30 年来,在医学、生物学家努力下,人类对于自身的认识已进入微观层次的剖析。从而,对于肿瘤发生、发展的机理也有了更明确的认识,乃是环境因素(外因)与人体内基因(内因)长期相互作用的结果,致使某些基因表达失常,导致细胞发生质的改变,而失控地异常增殖,形成癌症。从致癌物的入侵、参与体内代谢、癌基因被激活或抑癌基因失活、DNA 发生改变,直至癌的形成,具有一漫长的过程。从癌细胞仅限于腺体基底膜内原位癌,发展至有浸润、转移能力的进展期癌,也有一不短的发展历程。因此,癌症是一多阶段、缓慢发展的疾病,这样就为人们提供了一个揭露它的充分空间。尤其是,随着各种分子生物学应用技术的快速发展,各种高通量、高敏感性、大规模生物芯片分析及蛋白质组学研究的兴起,使肿瘤标志成为一门新兴的富有生命力的学科,应运而生。

肿瘤标志是指,由于相关基因的改变或蛋白质后修饰出现问题,组织细胞所表达出的蛋白质和生物活性物质,或是人体免疫功能和代谢异常产物在组织体液或排泄物中可检测到的活性物质或因子,包括 DNA、RNA 和蛋白质等生物分子。这些物质的检测将有助于临床对于疾病的认识。目前,虽然主要限于对肿瘤疗效或预后的判断以及肿瘤复发与否的监控,相信随着更多肿瘤标志的发现、更灵敏检测方法的建立以及选择多个肿瘤标志参数联合检测分析等,将会对于癌症的诊断、甚至高危个体的预警均会起到日益重要的作用。

本书是以万文徽教授为首的众多位从事该专业的同道多年来经验的总结,也是自 1996 年以来全国继续医学教育项目“肿瘤标志研究进展及临床应用”学习班教材的进一步完善与提高。反映了近年来国内、外在该领域的主要重大进展,是对临床医师,尤其是刚涉及从事肿瘤专业的同道们的一本很好的继续医学教育教材。相信本书的问世,定能推动我国肿瘤标志学科的发展,并将有助于肿瘤防治事业。



2005 年 3 月

序二

长期以来，医院治疗的肿瘤患者，以中、晚期居多，治愈率较低，虽然早期癌症患者疗效较好，但是仍有相当一部分患者难以治愈。肿瘤治疗的关键在于早期发现、早期治疗，这已成为人们的共识。目前医院诊断早期肿瘤，主要是靠影像学 and 细胞病理学诊断技术，一般都是在具有明显的占位性病变和临床症状后才得以确诊。可是从细胞癌变的生物学角度去理解，这种占位性病变已经不是癌变的最早期，早期癌的临床概念会随着科学技术的发展而进一步更新。事实上，随着新技术、新方法的出现，以及肿瘤发生、发展临床和基础研究的深入，人们已经开始诊断出更早期的肿瘤。然而，科学的发展使人们认识到治疗这种占位病变的肿瘤，可能还不是最终控制肿瘤的最有效的办法。当研究者们找到正常细胞是如何发展成不可逆转的癌细胞的答案时，也就是说，能够准确地预报目前尚难以发现的微小早期癌时，肿瘤早期发现才将会取得战略性的突破。到那个时候，也将会产生控制早期癌发生的更有效方法，使肿瘤的发生率明显下降。

近 20 多年来，人们对肿瘤细胞发生、发展的分子机理有了更多的认识。由于环境致癌因素与人体内基因的相互作用，导致某些基因表达异常。这种基因表达异常的不断累积，逐步使细胞的增殖/死亡动态平衡失调，最终使正常细胞生物学性质发生改变而成为癌细胞。有关细胞癌变的临床和基础研究进展迅速，尤其是近几年来随着人类基因组计划的完成，高通量、大规模基因分析技术的出现，以及蛋白质组学研究的兴起，人们已经开始对于细胞癌变从过去的单基因水平的研究转向集成式、多层次、信息化的综合研究。在 DNA、RNA、蛋白质、染色体以及细胞水平上观察到一系列和细胞癌变相关的变化，这些异常变化，实质上就是细胞癌变不同阶段的标志，这些标志的研究和确定，无论对于肿瘤的早期发现、早期诊断，还是对于肿瘤的预防和治疗都具有重要的应用价值。

正如前述，肿瘤是环境与宿主因素相互作用、多基因参与的复杂疾病，又具有多阶段性，缓慢发展的特点。往往不是单一层次上某一个简单的细胞功能改变决定了细胞癌变的命运。因此，我们不能设想任何一个单一的肿瘤异常改变（肿瘤标志）可以准确无误地用于肿瘤的早期发现和诊断，以及指导临床治疗。从单基因向多基因、从单一层次向集成层次、从细胞向整体的研究模式，已经逐渐成为未来肿瘤研究的主导方向。肿瘤标志的研究和应用，也会由单一标志向多个标志，以及标志谱（marker profiling）的方向发展。与癌变相关的 DNA、RNA、蛋白质、染色体以及细胞变化谱图（profiles）等将会逐渐被人们认识，这些与癌变相关的变化谱将会成为肿瘤标志谱（tumor marker profiles），更准确地用于指导肿瘤预防、诊断和治疗。在不久的将来，将会出现与肿瘤发生、发展相关的基因突变谱，基因甲基化谱、基因多态谱、基因表达谱、体液蛋白质（或其他化学成分）谱、染色体谱以及细胞和组织分子影像谱图等。其中尤以血液为代表的体液蛋白质（及其他化学成分）谱以及细胞、组织分子影像谱图将逐渐成为肿瘤标志研究领域中的热点，在未来肿瘤早期发现、早期治疗中发挥重要作用。这些集成式的肿瘤标志的出现和广泛应用，将会逐渐改变当前以诊治中、晚期肿瘤为主的被动局面，使肿瘤的早期发现、预防和控制成为可能。一系列与肿瘤防、控相关的新技术和方法也将得到广泛应用，人类将在战胜癌症的征途中迈出新的步伐。

《肿瘤标志临床应用与研究进展》一书，较系统地介绍了肿瘤标志的临床应用及其评价，尤其是关于近年来肿瘤研究领域的重要进展。相信本书的出版，将会进一步推动我国肿瘤标志的研究及其在临床上的广泛应用，为我国肿瘤的防治事业作出应有的贡献。

程书钧

2005 年 3 月

前言

肿瘤是给患者及其亲人带来深重痛苦的疾病，又是未被彻底解决的疾病。长久以来，攻克肿瘤一直是人类的理想，所以，一切有关肿瘤发生、增长、诊断与治疗等均成为医学生物学研究的重点课题。肿瘤的及时发现与诊断，对于提高患者治愈率、延长患者生命是至关重要的。因此，致力于肿瘤研究的学者对于探索与寻找有效的肿瘤标志从未松懈。有关学术团体纷纷频繁组织关于肿瘤标志研究与应用的交流。肿瘤标志的研究在肿瘤学中已经成为一个引人注目的领域。

1996年，卫生部开始建立国家级继续医学教育项目，在肿瘤领域内众多申请项目中获得批准的只有7项，“肿瘤标志临床应用与研究进展”就是其中之一。次年开始，每次被批准后，有效期为3年。本项目于1997年、2000年、2003年及2005年又连续4次被批准。至今，共举办过六次全国学习班。学习班所聘请的授课教师均为从事肿瘤基础、临床研究及在相关学科工作十五年以上，具有扎实、丰富的理论知识及实际经验，教学严谨、负责。学习班授课内容随着学科进展不断修正、补充。本书即是在此基础上，再扩展、吸收与肿瘤标志有关的、具有潜在应用价值的新研究及新技术进行编写而成。

当前，临床实际对于肿瘤的诊断，除病史、症状、体征、超声波、放射线、核磁、内窥镜及病理外，实验室辅助临床诊断所能进行的，主要是肿瘤标志的检测。因此激励编者依靠众学者智慧完成这部专著的原因有两个：一个是希望广大医务工作者能够正确认识、准确测定、科学合理地应用肿瘤标志；另一个是由于肿瘤是未被攻克的问题，所以认为在临床实践及基础研究中，无论是医师、研究者还是技术操作人员，不断树立应用与研究结合的意识是不可忽视的。

自20世纪90年代中以来，肿瘤标志的临床应用研究作为肿瘤研究的重点课题，再次广泛地引起人们的兴趣与关注。然而值得注意的是，近来众多肿瘤实验室已将对于肿瘤诊断标志及治疗靶位的探索结合起来，其所涉及内容之广泛与细致，令人难以总结及系统化。所以在本书编写过程中，结合当前肿瘤标志临床实际应用及基础研究进展情况，将有关内容归纳、划分为五章。为了使读者能够更清晰地了解各章内容，在每章开始时，均进行了扼要介绍，以供读者借鉴参考。各章内，每篇内容均又可分别独立成文。这里进行简单介绍。

第一章总论，包括肿瘤标志发展概况、概念及分类。

第二章肿瘤标志的获得及鉴定，目的是使读者进一步了解当前临床所使用的肿瘤标志的由来。从而，更深刻认识这些肿瘤相关抗原敏感度及特异度受限的根源，以便在临床实践应用中更好地掌握与分析。

第三章从血清/血浆肿瘤标志及组织细胞肿瘤标志两方面，分别介绍肿瘤标志的临床应用。血清/血浆肿瘤标志方面，除重点复习了当前临床所应用的肿瘤标志和测定方式外，对于肿瘤标志临床测定的评估方法、临床应用要点和应用中存在的问题及解决方法、质控和标准化以及关于血清/血浆肿瘤标志临床应用实施准则的讨论等方面，均提出了看法。组织细胞肿瘤标志方面，除介绍肿瘤标志在免疫组织化学分析中的临床应用外，分别重点介绍了已在肿瘤临床诊治中具有实际应用价值的乳腺激素受体及Her-2/neu产物蛋白。

第四章集中显示了,当前与肿瘤标志有关的主要研究进展,包括肿瘤遗传性标志、非遗传性分子生物学标志、人类端粒酶与肿瘤、细胞周期调控与肿瘤、实体瘤耐药基因及蛋白质组学在肿瘤研究中的现状等。每篇综述前均提供了中英文摘要及关键词,以便于读者在工作需要时进一步追踪。

第五章将当前肿瘤标志检测所接触的主要技术及原理研究进展分别介绍,帮助读者在需要应用时认识及选择。

此外,为了便于查找,在主要内容之后,总结出了中英文词汇对照检索。

希望,本书对于当前从事临床医学诊疗实践、从事肿瘤基础研究实践和从事检验医学实践的人员在具体工作中能够作为参考、有所用处。也希望对于有关技术人员在拓宽开发应用于肿瘤诊治产品的思路,能够有所帮助。

我衷心感谢参加编写本书的各位专家、同道及朋友,感谢他们在繁忙的工作中,额外辛勤完成所承担的写作部分。衷心感谢北京大学医学出版社的指导与支持。

并且,特别感谢我的老领导、北京大学临床肿瘤学院北京市肿瘤防治研究所北京肿瘤医院的创建者徐光炜教授及中国工程院院士、中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤研究所程书钧教授为本书书写序言。

不妥之处,恭请批评指正。

万文徽

2005年3月

目 录

第一章 总 论

一、肿瘤标志发展概况·····	1
二、肿瘤标志的概念及分类·····	2

第二章 肿瘤标志的获得及鉴定：抗原和抗体

第一节 肿瘤抗原的研究、鉴定及应用·····	6
一、抗原及肿瘤抗原的一般概念·····	6
二、肿瘤抗原的特点·····	8
三、肿瘤抗原的加工和呈递·····	10
四、肿瘤抗原的研究方法·····	11
五、肿瘤抗原的鉴定·····	14
六、肿瘤抗原的应用·····	16
七、肿瘤抗原研究的展望·····	19
第二节 抗体的生物学特性及抗体的制备和应用·····	20
一、机体的免疫系统及抗体的产生·····	21
二、抗体的分子结构·····	23
三、免疫球蛋白的基因结构及重组·····	29
四、抗体的生物学功能·····	36
五、抗体工程·····	41
六、抗体的分离纯化技术·····	51
七、抗体与抗原的反应及反应模式·····	55
八、抗体应用存在的问题及前景·····	58

第三章 肿瘤标志的临床应用

第一节 血清/血浆肿瘤标志及其测定方式·····	62
一、血清/血浆肿瘤标志·····	62
二、血清/血浆肿瘤标志测定方式·····	103
第二节 血清/血浆肿瘤标志临床测定的评估·····	115
一、诊断试验评价的资料准备·····	115
二、诊断试验评价指标·····	116
三、接受器工作特异性曲线·····	118

四、关于血清/血浆肿瘤标志的临界参考值	118
第三节 血清/血浆肿瘤标志临床应用要点	120
一、血清/血浆肿瘤标志在肿瘤临床诊治中的作用	121
二、血清/血浆肿瘤标志临床应用需要注意的问题及解决办法	122
第四节 血清/血浆肿瘤标志免疫测定的质量控制和标准化	126
一、影响血清/血浆肿瘤标志免疫测定的因素	126
二、目前国内血清肿瘤标志测定存在的问题	128
三、血清/血浆肿瘤标志临床免疫测定标准化的一般原则	132
四、甲胎蛋白、前列腺特异抗原和癌胚抗原测定的标准化	135
第五节 关于血清/血浆肿瘤标志临床应用实施准则	137
第六节 组织细胞肿瘤标志	145
一、免疫组化染色方法	145
二、免疫组化结果读判	153
三、免疫组化在肿瘤临床中的应用	158
第七节 乳腺癌雌激素、孕激素受体测定的临床意义	166
一、雌激素受体的结构	167
二、受体的作用机制	167
三、受体作用的特点	169
四、雌激素受体和孕激素受体的测定方法	169
五、受体的放射性配体结合分析法	170
六、测定乳腺癌雌激素受体和孕激素受体的临床意义	172
第八节 HER-2/neu 基因产物在乳腺癌诊断治疗中的作用	173
一、HER-2/neu 的结构与功能	173
二、HER-2/neu 和乳腺癌	175
三、HER-2 的检测	178
四、结语	180

第四章 肿瘤标志的研究进展

第一节 肿瘤遗传标志及其应用	182
一、肿瘤的遗传方式	183
二、肿瘤相关基因作为遗传标志的应用价值	189
第二节 实体肿瘤分子生物标志的研究和应用	195
一、实体肿瘤分子生物标志存在的理论依据	196
二、肿瘤分子生物标志测定的内容及方法	197
三、肿瘤分子生物标志测定的对象	199
四、多种肿瘤标志的综合分析	200
五、肿瘤分子生物标志测定中的问题及对策	201
六、肿瘤分子生物标志的应用前景	202

第三节 儿童急性淋巴细胞白血病分子标志的研究现状及进展	205
一、t (1; 19) (q23; p13) 及其形成的 E2A/PBX1 融合基因	206
二、MLL 基因重排及其形成的融合基因	207
三、t (12; 21) (p13; q22) 易位及其形成的 TEL/AML1 融合基因	209
四、t (9; 22) (q34; q11) 易位及其形成的 BCR/ABL 融合基因	210
五、免疫球蛋白及 T 细胞受体基因重排	212
六、儿童 ALL 分子标志定量检测存在的问题及展望	214
第四节 肿瘤转移生物学标志及其临床意义	218
一、肿瘤转移的过程	219
二、黏附分子	220
三、蛋白质水解酶及其抑制剂	223
四、调节肿瘤微血管生成的相关因子	227
五、肿瘤转移标志检测	228
六、小结	232
第五节 人类端粒酶与肿瘤	233
一、端粒的结构与功能	234
二、端粒与细胞老化、永生化	235
三、端粒酶、肿瘤与细胞分化	235
四、端粒酶检测	238
五、端粒酶作为肿瘤治疗的靶点	239
六、展望	241
第六节 细胞周期调控与肿瘤	242
一、细胞周期的概念	243
二、细胞周期调控	244
三、细胞周期与肿瘤	250
第七节 对于 p16 与 pRb 在细胞周期调控中作用的认识	256
一、p16 抑癌基因的研究进展	257
二、对于 Rb 基因在肿瘤中作用与调控的认识	263
三、展望	266
第八节 实体瘤耐药机制研究进展	269
一、药理性耐药	271
二、典型获得性 MDR	271
三、微环境与耐药	277
四、环氧化酶-2 与耐药	280
五、小结	281
第九节 蛋白质组学在肿瘤研究中的现状	283
一、蛋白质组学研究方法	284
二、蛋白质组学在肿瘤研究中的应用	285
三、蛋白质组研究的应用前景及存在的问题	289

第五章 肿瘤标志主要检测技术研究进展

第一节 蛋白质组学技术的进展	293
一、蛋白质组学定义的发展	293
二、蛋白质组学研究的必要性、复杂性、长期性与挑战性	293
三、蛋白质组学研究及相关技术的发展	294
第二节 双向电泳技术及其进展	296
一、双向电泳的原理	297
二、双向电泳技术流程	297
三、双向电泳技术的进展	301
第三节 生物质谱与蛋白质组学	303
一、生物质谱学发展概况	303
二、质谱学基本概念	304
三、质谱仪的基本结构	305
四、生物质谱在蛋白质组学研究中的应用	309
五、生物质谱与生物信息学	314
第四节 生物芯片	315
一、基因芯片	316
二、组织芯片	319
三、蛋白芯片技术及其应用	325
第五节 免疫芯片	330
一、免疫芯片的分类	330
二、免疫芯片的关键技术	330
三、免疫芯片技术存在的问题	331
四、液态免疫芯片	332
五、免疫芯片的应用	334
第六节 实时荧光定量 PCR 技术及其应用	335
一、技术基础	335
二、实时监测的化学物质及标记探针类型	335
三、实时荧光定量 PCR 的应用	339
第七节 时间分辨荧光免疫分析技术在肿瘤标志检测中的应用	345
一、时间分辨荧光免疫分析的原理	347
二、时间分辨荧光免疫分析的标记	349
三、时间分辨荧光免疫分析的方法	350
四、增强液	351
五、时间分辨荧光分析测量仪器	351
六、时间分辨荧光免疫分析的影响因素	352
七、时间分辨荧光免疫分析的发展前景	352
第八节 电化学发光免疫分析	353

一、电化学发光免疫分析的基本原理·····	353
二、电化学发光免疫分析的特点·····	355
第九节 化学发光免疫分析·····	356
一、化学发光免疫分析的发展由来·····	356
二、化学发光反应·····	357
三、化学发光免疫分析·····	361
四、化学发光免疫分析的特点和发展前景·····	367
第十节 胶体金免疫层析技术及其在肿瘤标志检测中的应用·····	370
一、免疫胶体金技术的基本原理·····	370
二、胶体金的制备方法·····	370
三、胶体金标记技术·····	372
四、胶体金的稳定性及免疫胶体金的储存·····	374
五、免疫层析技术·····	374
六、现状和展望·····	377
第十一节 酶免疫测定·····	377
一、原理·····	378
二、操作流程、类型及使用范围·····	378
三、特点·····	380
四、基本实验条件·····	380
五、正确进行 ELISA 测定的要点·····	383
六、ELISA 方法的改进与发展·····	386
七、实验室中的几种酶联免疫测定方法及其用途·····	387
第十二节 肿瘤标志放射免疫分析进展·····	388
一、现代免疫分析的历史背景·····	389
二、现代免疫分析的构成和方法设计·····	390
三、对形成灵敏度诸因素的分析·····	391
四、微点阵分析的原理与特性·····	392
中英文专业词汇对照索引	
后记	

第一章 总 论

多少年来,人们一直在探索并希望获得肿瘤出现前或肿瘤刚刚出现痕迹时的标志。虽然至今尚未确定能够用于临床的、理想的肿瘤标志,但是近一个半世纪内,在医学生物学领域各个学科(包括医学生物学技术)研究开发的基础上,对于肿瘤标志的认识、研究与应用,的确得到了进展。在这本书的开始,首先,对于肿瘤标志发展概况简单地进行总结,并且,重新归纳了对于肿瘤标志概念及分类的认识。在后面的各章,将顺序介绍:与肿瘤标志获得有关的理论,肿瘤标志的临床应用状况,当前肿瘤标志的研究进展,以及与肿瘤标志检测有关的较为先进的技术原理。

一、肿瘤标志发展概况

追溯起来,第一个肿瘤标志(tumor marker)是1846年由 Bence-Jones 所证实的本周蛋白(Bence-Jones protein)。这是在中发性骨髓瘤患者酸性尿中的沉淀蛋白,为单克隆免疫球蛋白的轻链,至今仍在临床中应用。

沉寂了近 100 年,进入20世纪后,1930 年 Zondek 发现了人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG),1932 年 Cushing 发现了促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH),1959 年 Market 等发现并应用与肿瘤诊断有关的酶与同工酶。在恶性疾病中,这些激素、酶、同工酶、及其他蛋白质的浓度在体液中会发生改变。

此期间,微量免疫检测技术也得到迅速发展。1941 年 Coons 与 Kaplam 将荧光素与抗体结合检测组织中抗原的定位,发展为各种类型的荧光免疫测定(fluoroimmunoassay, FIA)技术。1959 年 Berson 与 Yalow 创立了放射免疫测定(radioimmunoassay, RIA)技术。在此基础上,1966 年美国的 Nakane P. K. 与 Pierce D. B.^[1]及法国的 Avrameas 与 Urie J.^[2]等开始介绍酶免疫技术。直到 1971 年,瑞典的 Engvall 等^[3]与荷兰的 Van weema 等^[4]几乎同时分别建立了酶免疫测定法,命名为酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)。

从 20 世纪 60 年代至 70 年代,肿瘤标志在临床中才开始被普遍应用。因为,1963 年 Abelev 发现了甲胎蛋白(α -fetoprotein, AFP),1965 年 Gold 及 Freeman 发现了癌胚抗原(carcinoembryonic antigen, CEA)。AFP 及 CEA 的发现激发起广大肿瘤研究者寻找其他肿瘤“特异抗原”的希望与热情。1975 年, Köler 和 Milstein 为建立 B 淋巴细胞杂交瘤技术(B lymphocyte hybridoma technique)而获得诺贝尔奖金^[5],这是 20 世纪 70 年代医学生物学界的两大革命之一。此技术使得寻找肿瘤未知抗原的研究成为可能。20 世纪 80 年代,人们应用此技术制备了多种抗不同肿瘤的单克隆抗体(monoclonal antibody, McAb)^[6~10],例如,癌抗原 125(cancer antigen 125, CA125)、癌抗原 15-3(cancer antigen 15-3, CA15-3)及糖抗原 19-9(carbohydrate antigen 19-9, CA 19-9)等均是那时由 Koprowski 的实验室(美国, The Wistar Institute)研制出的。前列腺特异性抗原(prostate specific antigen, PSA)也是那时被发现的。

同时,20世纪60年代末70年代初,自Jensen及Terenlus等分别对乳腺癌细胞内雌激素受体(estrogen receptor, ER)及孕激素受体(progesterone receptor, PR)进行分析以来,这些类固醇类的激素受体对于乳腺癌预后判断及指导内分泌治疗的作用,在临床上得到了证实。

20世纪70年代与80年代,医学生物学领域另一革命DNA重组及分子生物学技术建立。在此基础上,1980年,癌基因(oncogene)被发现。对于癌基因及其产物的研究日益深入,显示出,某些癌基因、抑癌基因(suppressor gene)及其表达产物的检测,可能具有早期发现特定肿瘤产生及判断预后的意义。1989年,Strowm等首次证实,循环血液中增加的DNA含量主要来自肿瘤的释放^[11],1994年,Sorenson等在实体肿瘤患者血浆中发现ras基因的突变^[12]。1996年,两个实验室分别在小细胞肺癌和头颈肿瘤患者的血浆中发现微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)^[13,14]。自20世纪90年代中以来,更多的实验室开始对于实体肿瘤患者血浆中个别DNA标志进行分析^[15~17]。国内外肿瘤医学生物学专家发现,P53、结肠腺瘤性息肉(adenomatous polyposis coli, APC)基因、K-ras基因的突变、染色体杂合缺失(loss of heterozygosity, LOH)、以及抑癌基因启动子的甲基化(metylation),可发生于绝大多数实体肿瘤中,而且,不同肿瘤内的变化有所区别。因此,对于循环血液中DNA进行分析,必将可以获得有效地用于实体肿瘤相对特异的诊断标志。

20世纪90年代中期,针对癌基因和抑癌基因研究的有关问题提出了人类基因组计划(human genome project, HGP),此计划全面启动、逐步实施,并且在相关学科发展的配合下,迅速获得了人类、很多动植物及微生物基因组序列。大量遗传信息需要进行高效、快速检测及分析,这奠定了生物芯片(biochip)产生的基础^[18]。生物芯片包括基因芯片(gene microarray)、蛋白芯片(protein microarray)及细胞和组织芯片(cell and tissue microarray)等,主要特点是高通量、微型化和自动化。众多科学家已将此技术用于或尝试用于肿瘤及肿瘤标志的研究及应用。

当前,人类基因组计划已进入后基因时代,研究要点已转到功能基因组学上,而生物功能主要体现者是蛋白质。近几年,人们提出并完善了蛋白质组(proteome)及蛋白质组学(proteomics)的概念^[19,20]。其包括正常组织细胞与病理组织细胞蛋白质的分离技术,如电泳及层析等;质谱分析;以及特异的检测方法。在蛋白质组分析应用上,有关肿瘤的研究自20世纪90年代开始,这为探索肿瘤标志的研究技术、寻找特异肿瘤标志的可能,提供了又一可循的途径。

二、肿瘤标志的概念及分类

(一) 肿瘤标志的概念^[21~23]

随着肿瘤研究的深入进展,近10年来,人们对于“肿瘤标志”概念的认识也越来越趋向完整。

一般而言,肿瘤标志是指存在于肿瘤细胞内或肿瘤细胞表达及脱落的物质,或是宿主对于体内肿瘤反应而产生的物质。其存在于细胞胞浆、胞核中、或细胞膜表面,也可见于循环血液、其他体液或组织中。这些物质,有的不存在于正常人体内,只见于胚胎中;有的只在肿瘤患者体内出现;还有的在肿瘤患者体内含量超过正常人体内含量。通过化学、免疫学、及基因组学等方法测定其存在或含量,证实肿瘤的存在、分析病程、监测疗效和复发以及判