

chemotherapy for stage II colon cancer with poor prognostic features [J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29 (25): 3381-3388.

- [14] Sobrero A. Should adjuvant chemotherapy become standard treatment for patients with stage II colon cancer? For the proposal [J]. *Lancet Oncol*, 2006, 7(6): 515-516.
- [15] Hsu TC, Chen HH, Yang MC, et al. Pharmacoeconomic analysis of capecitabine versus 5-fluorouracil/leucovorin as adjuvant therapy for stage III colon cancer in Taiwan [J]. *Value Health*, 2011, 14(5): 647-651.
- [16] Van Cutsem E, Tabernero J, Lakomy R, et al. Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen [J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(28): 3499-3506.
- [17] Hong TS, Ritter MA, Tomé WA, et al. Intensity-modulated radiation therapy: emerging cancer treatment technology [J]. *Br J Cancer*, 2005, 92(10): 1819-1824.
- [18] Cantero-Munoz P, Urién MA, Ruano-Ravina A. Efficacy and safety of intraoperative radiotherapy in colorectal cancer: a systematic review [J]. *Cancer Lett*, 2011, 306(2): 121-133.
- [19] Daly ME, Kapp DS, Maxim PG, et al. Orthovoltage intraoperative radiotherapy for locally advanced and recurrent colorectal cancer [J]. *Dis Colon Rectum*, 2012, 55(6): 695-

702.

- [20] Loupakis F, Bria E, Vaccaro V, et al. Magnitude of benefit of the addition of bevacizumab to first-line chemotherapy for metastatic colorectal cancer: meta-analysis of randomized clinical trials [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2010, 29: 58.
- [21] Hurwitz HI, Lyman GH. Registries and randomized trials in assessing the effects of bevacizumab in colorectal cancer: is there a common theme? [J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(6): 580-581.
- [22] Ranpura V, Hapani S, Wu S. Treatment-related mortality with bevacizumab in cancer patients: a meta-analysis [J]. *JAMA*, 2011, 305(5): 487-494.
- [23] Vale CL, Tierney JF, Fisher D, et al. Does anti-EGFR therapy improve outcome in advanced colorectal cancer? A systematic review and meta-analysis [J]. *Cancer Treat Rev*, 2012, 38(6): 618-625.
- [24] Brivio F, Fumagalli L, Lissoni P, et al. Pre-operative immunoprophylaxis with interleukin-2 May improve prognosis in radical surgery for colorectal cancer stage B-C [J]. *Anticancer Res*, 2006, 26(1B): 599-603.
- [25] Iwasaki M. Cancer incidence and novel therapies developed in Japan [J]. *J Stem Cells Regen Med*, 2012, 8(3): 203-204.

(收稿日期: 2015-04-17 修回日期: 2015-06-22)

• 综述 • doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2015.28.038

化学发光免疫法在肿瘤生物标志物检验中的应用*

肖忠华 综述, 黄海兵 审校

(重庆三峡医药高等专科学校, 重庆万州 404120)

[关键词] 化学发光免疫法; 纳米材料; 肿瘤生物标志物; 核酸适配体; 化学发光能量共振转移

[中图分类号] R446.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)28-4003-02

恶性肿瘤严重威胁人类健康, 肿瘤生物标志物检验对于恶性肿瘤筛查、早期诊断、预后、疗效评估具有重要意义。化学发光免疫法指利用标记在抗体上物质发光检验的方法, 灵敏度高, 选择性好, 通常包括酶标化学发光和无酶标记化学发光方法。化学发光免疫法广泛应用于肿瘤生物标志物检验。随着纳米金、石墨烯和多碳纳米管等纳米材料, 核酸适配体, 磁性微球, 脂质体, 人工模拟酶等的应用^[1-3], 肿瘤生物标志物化学发光免疫法检验取得了较大的进步。本文就近年来化学发光免疫法在肿瘤生物标志物检验研究进展进行综述。

1 构建功能界面

对磁性微球、纳米金等纳米材料等进行亲水性改造, 构建负载双抗夹心中的一抗和竞争或非竞争免疫反应中的标记抗原或标记抗体的功能界面, 可提高非均相免疫反应中免疫复合物浓度可以降低检测限, 提高检测灵敏度。直径在 1~100 nm 的纳米金指金的微小颗粒, 具有高电子密度、介电特性和催化作用; 石墨烯是仅有单原子厚度的二维碳原子晶体, 具有较大的比表面积; 纳米金和石墨烯均易与多种生物分子相结合且不

影响其活性。应用纳米金和石墨烯两种纳米材料功能化微免疫反应单元后 链霉亲和素化后连接上亲和素化 AFP 捕获抗体, AFP 检测限低至 0.61 pg/mL^[4], 全部免疫反应时间缩短为 24 min, 如与仅以链霉亲和素连接生物素标记 AFP 捕获抗体功能化微免疫反应单元化学发光信号强度相比较, 纳米金和石墨烯联用信号强度增加了近 7 倍, 单用氧化石墨烯或单用纳米金信号强度增加几乎一致, 只增加了约 2 倍。

磁性微球是具有一定磁性及特殊结构的复合微球, 可通过共聚及表面改性等方法赋予其表面功能基(如 -OH、-COOH、-CHO、-NH₂ 等), 在外加磁场作用下还具有导向功能。比表面积较大的磁性微球不仅可以包被更多的捕获抗体, 同时也起着分离免疫复合物的作用, 便于增大非均相反应中免疫复合物浓度, 提高线性范围和降低检测限, 缩短反应时间, 如化学发光免疫双抗夹心法检验 CEA、甲胎蛋白(AFP)、PSA 中^[5-7], 而将抗体包被于磁性微反应管中则效果相对较差。正如纳米金具有催化作用一样, 应用磁性纳米球在快速灵敏检验肿瘤生物标志物中有更好的前景, Zhang 等^[8] 比较包被磷脂酰

* 基金项目: 重庆市教委科学技术研究项目(KJ131804)。 作者简介: 肖忠华(1974—), 硕士, 副教授, 主要从事生物分析化学的研究。

肌醇蛋白聚糖-3(GPC3)抗体的磁纳米(100 nm)和磁性微球(2 μm)竞争免疫法测定血清 GPC3 水平,结果表明,相对于采用包被 GPC3 的磁性微球,采用包被 GPC3 磁纳米虽然线性范围却没有变化,但检测限降低了近 3 倍,反应时间缩短了一半。

2 信号探针放大

双抗夹心免疫中,直接将酶标二抗包被在纳米金上、包被二抗在层层封装多层酶的碳纳米管或封装较多酶的脂质体等改进信号探针的方式均可以增强化学发光信号,进一步提高检测灵敏度。

以一抗包被磁性微球,张书圣课题组分别基于二抗包被双编码纳米金对碘酚增强 HRP 鲁米诺体系^[9]、二抗包被胶体纳米金溴酚蓝增强 HRP 鲁米诺体系^[10]、多碳纳米管层层组装 HRP 酶标二抗溴酚蓝增强鲁米诺体系检验 AFP^[11]以 G-四联体/血红素-二抗包被纳米金基于增强 HRP 鲁米诺体系分析 CEA^[12],他们的检测限都低至 pg 级,比不用纳米金时检测限降低了 1 个数量级,证实金纳米具有较好催化和信号放大作用,同时 G-四联体/血红素具有类似 HRP 的酶活性。

脂质体(liposome)是一种人工膜,当两性分子如磷脂和鞘脂分散于水相时,分子的疏水尾部倾向于聚集在一起,避开水相,而亲水头部暴露在水相,形成具有双分子层结构的封闭囊泡,称为 liposome。Zheng 等^[13]将二抗包被在封装 HRP 脂质体上,与包被在微孔板上的 PSA 一抗反应,线性范围达到 6 个数量级,检测限为 0.7 pg 级。

锰卟啉人工模拟酶具有与 HRP 类似的催化活性,可与双链 DNA 以沟槽作用相结合而不与单链 DNA 结合,有抗原存在时,以链霉素和素和生物素接合引物链的二抗与包被在磁性微球上的一抗形成的免疫复合物,在存在两条互补发夹结构 DNA 和锰卟啉时,互补发夹 DNA 在引物引发下发生滚环扩增,从而接合大量的锰卟啉酶,基于对碘酚增强鲁米诺体系测定 CEA,其线性范围达 5 个数量级,检测限 6.8 pg/mL^[14]。

3 化学发光共振能量转移(CRET)

CRET 是将能量由化学发光反应的供体分子传递给合适的能量受体分子,由于其不需要激发光源,降低了背景光的干扰,消除了体系的荧光漂白,减少了自发荧光,日益受到人们的关注。Yang 等^[15]以 HRP 标记抗原,异硫氰酸荧光素标记抗体,竞争免疫反应后经微芯片电泳分离过量酶标抗原后,加入鲁米诺化学发光,基于 CRET 到异硫氰酸荧光素而信号增强来测定 NSE,相比较于不采用 CRET,检测限低了 2 个数量级;Ogaidi 等^[16]、Huang 等^[17]将一抗分别包被于负载量子点的石墨烯功能化反应管和纳米金中,HRP 酶标记二抗,基于双抗夹心法形成的免疫复合物在鲁米诺体系中的化学发光可以被石墨烯、纳米金淬灭测定了 CA125、AFP,检测限分别可达 0.05 U/L、2.5 ng/mL。

4 核酸适配体(apptamer)

apptamer 是一类具有类似抗体对靶分子具有高亲和性、高特异性结合的单链寡核苷酸,可以是单链 DNA(ssDNA),也可以是 RNA。吸附 2-氧甲基改性 p53 RNA 核酸适配体的金纳米不容易聚集成较大颗粒,对鲁米诺化学发光催化作用较弱,如果样本中存在 p53,则 apptamer 结合 p53 后脱附金纳米,结果金纳米发生聚集,强烈催化鲁米诺体系发光,既可以利用金纳米从红色到紫色的颜色反应也可以利用化学发光强度检验 p53,颜色反应检测限低至 ng,而化学发光则检测限低至 pg 级^[18]。在以 TEX615 标记的 PSA apptamer 捕获 PSA 后,以磁性石墨烯吸附分离未反应完的 PSA apptamer, N, N'-二咪唑基乙二酰胺(1,10-oxalyldiimidazole chemiluminescence)作为化学

发光剂检验 PSA,结果表明以磁性石墨烯吸附分离后化学发光信号比只用石墨烯或不用石墨烯(如只用石墨烯,游离 aptamer 也可被吸附,但其发光可因共振到石墨烯上而淬灭;值得注意的是不用石墨烯时其信号仅下降了 1/20)时下降了近 100 倍,大大提高了检测灵敏度并缩短反应时间为 40 min^[19]。基于连接 6-羧基荧光素的富含鸟嘌呤 DNA aptamer 与 3,4,5-三甲氧基苯乙酰基甲醛(TMPG)反应形成高能中间体能量可转移到 6-羧基荧光素增强化学发光,而存在 PSA 抗原时,化学发光被 PSA 淬灭测定血清中 PSA,检测限达到 1.0 ng/mL,反应时间缩短为 30 min^[20]。

5 展望

近年来,由于采用直接或间接使用纳米材料等构建的功能界面,结合应用脂质体、纳米材料等信号放大探针、核酸适配体,以及化学能量共振转移等,肿瘤生物标志物化学发光免疫法检验朝着高灵敏方向快速发展。而由于采用传感器阵列^[21]、多酶标记^[22]等的应用,化学发光免疫法在快速和多组分方面也取得了长足进步^[23]。

参考文献

- [1] Khan P, Idrees D, Moxley MA, et al. Luminol-based chemiluminescent signals: clinical and non-clinical application and future uses[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, 173(2): 333-355.
- [2] Pei X, Zhang B, Tang J, et al. Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: A review[J]. *Anal Chim Acta*, 2013(758): 1-18.
- [3] Iranifam M. Analytical applications of chemiluminescence-detection systems assisted by magnetic microparticles and nanoparticles[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2013(51): 51-70.
- [4] Yang Z, Luo S, Li J, et al. A streptavidin functionalized graphene oxide/Au nanoparticles composite for the construction of sensitive chemiluminescent immunosensor[J]. *Anal Chim Acta*, 2014(839): 67-73.
- [5] Qu S, Liu J, Luo J, et al. A rapid and highly sensitive portable chemiluminescent immunosensor of carcinoembryonic antigen based on immunomagnetic separation in human serum[J]. *Anal Chim Acta*, 2013(766): 94-99.
- [6] Zhang QY, Chen H, Lin Z, et al. Comparison of chemiluminescence enzyme immunoassay based on magnetic microparticles with traditional colorimetric ELISA for the detection of serum α -fetoprotein[J]. *J Pharm Anal*, 2012, 2(2): 130-135.
- [7] Liu R, Wang C, Jiang Q, et al. Magnetic-particle-based, ultrasensitive chemiluminescence enzyme immunoassay for free prostate-specific antigen[J]. *Anal Chim Acta*, 2013(801): 91-96.
- [8] Zhang QY, Chen H, Lin Z, et al. Chemiluminescence enzyme immunoassay based on magnetic nanoparticles for detection of hepatocellular carcinoma marker glypican-3[J]. *J Pharm Anal*, 2011, 1(3): 166-174.
- [9] Yang XY, Guo YS, Bi S, et al. Ultrasensitive enhanced chemiluminescence enzyme immunoassay for the determination of α -fetoprotein amplified by double-codified Gold nanoparticles labels[J]. *Biosens Bioelectron*, 2009, 24(8): 2707-2711.

需求方,不仅需要提供资金,还需要代表患者与医疗机构沟通,通过制定牵制医院行为的相关准则,利用其专业知识参与资金的全程运作,达到提高资金使用效率的目的。

4.3 商业保险需探索新的管理模式 商业保险在参与社会医疗保险的过程中,也需要根据我国的实际情况,探索出新的管理模式。如 2014 年,泰康人寿进一步升级三甲医院临床诊疗+社区配建二级康复医院+CCRC 持续关爱养老社区“3 层次医养服务体系,形成保险、医疗、养老兼及的新模式;平安保险在名医医疗中建设医疗与保险相结合的产业平台等等。新政策鼓励支持商业保险机构更多的参与社会医疗保障,但同时也是对商业保险机构的挑战。商业医疗保险需要在定位清晰的前提下,不牺牲公共资源、不伤及医疗卫生体系的根本利益,对引入的医疗人员和管理机构的资质进行评定,根据政府政策要求运营,积极配合行业监管,融合医疗人员和管理人员的关系等。商业保险在探索发展新的管理模式的过程中,仍需要很多努力。

参考文献

- [1] 中国保险监督管理委员会. 2012 年保险业经营情况表[EB/OL]. (2013-01-22)[2014-9-19]. <http://www.circ.gov.cn/web/site0/tab5201/info234401.htm>
- [2] 曾亮亮,赵婧. 医改新思路:医疗保险有望充当主力[N/OL]. 经济参考报,2014-9-3(5)[2014-09-15]. http://www.bj.xinhuanet.com/2014-09/03/c_1112345410.htm.
- [3] 朱晓红. 基于公私合作方式推进全民医保的风险与规

避——以广东湛江医改模式为例[J]. 广东工业大学学报:社会科学版,2013,13(2):53-58.

- [4] 郑言今. 四方共赢“湛江模式”值得推广[N/OL]. 21 世纪经济报道,2011-11-25(5)[2014-9-16]. http://www.mof.gov.cn/pub/shehuibaozhangsi/zhengwuxinxi/difangxinxi/201111/t20111128_610786.html.
- [5] “湛江模式”催生医保新样本[N/OL]. 中国青年报,2011-3-7(11)[2014-9-16]. http://news.ifeng.com/gundong/detail_2011_03/07/5004762_0.shtml.
- [6] 顾昕. 湛江模式启示录[J]. 中国医院院长,2010,10(20):49-51.
- [7] 张功震. 新型农村合作医疗中的道德风险及防范[J]. 医学与哲学,2008,29(12):38-40.
- [8] 张杰. 商业保险公司参与社会医疗保险管理的模式分析[J]. 西部金融,2013,11(11):9-13.
- [9] 毛晓梅. 已无退路只能进保险公司参与新农合为何踌躇[N/OL]. 中国保险报. 2007-3-21(8)[2014-9-18]. <http://finance.sina.com.cn/money/insurance/bxsd/20070321/14553427526.shtml>
- [10] 贾丽. 新农合引入商业保险案例分析和应用研究[D]. 北京:首都经济贸易大学,2013:47.
- [11] 中国经济体制改革研究会公共政策研究中心长策智库. 湛江模式的启示:探索社会医疗保险与商业健康保险的合作伙伴关系[J]. 中国市场,2011,3(3):35-39.

(收稿日期:2015-04-12 修回日期:2015-05-16)

(上接第 4004 页)

- [10] Bi S, Yan Y, Yang X, et al. Gold nanolabels for new enhanced chemiluminescence immunoassay of alpha-fetoprotein based on magnetic beads[J]. Chemistry, 2009, 15(18):4704-4709.
- [11] Bi S, Zhou H, Zhang S. Multilayers enzyme-coated Carbon nanotubes as biolabel for ultrasensitive chemiluminescence immunoassay of cancer biomarker[J]. Biosens Bioelectron, 2009, 24(10):2961-2966.
- [12] Wang C, Wu J, Zong C, et al. Highly sensitive rapid chemiluminescent immunoassay using the DNzyme label for signal amplification[J]. Analyst, 2011, 136(20):4295-4300.
- [13] Zheng YE, Chen H, Liu XP, et al. An ultrasensitive chemiluminescence immunosensor for PSA based on the enzyme encapsulated liposome[J]. Talanta, 2008, 77(2):809-814.
- [14] Xu J, Wu J, Zong C, et al. Manganese porphyrin-dsDNA complex: a mimicking enzyme for highly efficient bioanalysis[J]. Anal Chem, 2013, 85(6):3374-3379.
- [15] Yang T, Vdovenko M, Jin X, et al. Highly sensitive microfluidic competitive enzyme immunoassay based on chemiluminescence resonance energy transfer for the detection of neuron-specific enolase[J]. Electrophoresis, 2014, 35(14):2022-2028.
- [16] Al-Ogaidi I, Gou H, Aguilar ZP, et al. Detection of the ovarian cancer biomarker CA-125 using chemiluminescence

resonance energy transfer to graphene quantum dots[J]. Chem Commun(Camb), 2014, 50(11):1344-1346.

- [17] Huang X, Ren J. Gold nanoparticles based chemiluminescent resonance energy transfer for immunoassay of alpha fetoprotein cancer marker[J]. Anal Chim Acta, 2011, 686(1/2):115-120.
- [18] Shwetha N, Selvakumar LS, Thakur MS. Aptamer-nanoparticle-based chemiluminescence for p53 protein[J]. Anal Biochem, 2013, 441(1):73-79.
- [19] Choi HK, Lee JH. Role of magnetic Fe₃O₄ graphene oxide in chemiluminescent aptasensors capable of sensing tumor markers in human serum[J]. Analytical Methods, 2013, 5(24):6964-6968.
- [20] Cho T, Cho S, Kim YT, et al. Rapid aptasensor capable of simply diagnosing prostate cancer[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2014, 62:31-37.
- [21] Zong C, Wu J, Wang C, et al. Chemiluminescence imaging immunoassay of multiple tumor markers for cancer screening[J]. Anal Chem, 2012, 84(5):2410-2415.
- [22] Wei W, Zhang C, Qian J, et al. Multianalyte immunoassay chip for detection of tumor markers by chemiluminescent and colorimetric methods[J]. Anal Bioanal Chem, 2011, 401(10):3269-3274.
- [23] 汪晨,吴洁,宗晨,等. 化学发光免疫分析方法与应用进展[J]. 分析化学, 2012, 40(1):3-10.

(收稿日期:2015-04-13 修回日期:2015-06-20)