

综上所述,鼻咽癌患者在放射治疗中随着照射剂量的增加,HRV及胃排空率均明显下降,提示一方面鼻咽癌患者放疗后,可能主要通过抑制迷走神经张力,使自主神经对心脏的调节能力下降,影响交感-迷走神经平衡,从而使交感神经占优势,增加了发生恶性心律失常的风险;另一方面,通过抑制迷走神经张力,引起胃排空功能障碍。因此,通过HRV分析能了解放射所致的心脏自主神经调节功能改变,间接地评价放射性自主神经功能,为临床治疗提供了重要依据。

参考文献

- 1 中华心血管病杂志编委会心率变异性对策专题组. 心率变异性检测临床应用的建议[J]. 中华心血管病杂志, 1998, 26(4): 252-255.
- 2 陈洪波, 刘仁光. 心率变异性分析临床应用研究近况[J]. 新医学, 2010, 41(6): 407-410.
- 3 熊萍, 连捷. 恶性肿瘤患者的心率变异性临床初探[J]. 实用医技杂志, 2006, 13(1): 17-18.
- 4 刘家斌, 李广生. 放射性脑损伤机制及放射保护研究进展[J]. 赣南医学院学报, 2010, 30(1): 161-162.
- 5 王艺明, 刘兴德, 董为伟, 等. 脑源性心脏自主神经功能紊乱的干预研究[J]. 临床内科杂志, 2004, 21(4): 267-269.
- 6 陈晨, 刘海媛. 不同分期恶性肿瘤患者的心率变异性分析[J]. 复旦大学学报(医学版), 2009, 36(4): 413-416.
- 7 王志红, 周兰妹. 危重症护理学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2007: 289-290.
- 8 Urbain JL, Charkes ND. Recent advances in gastric emptying scintigraphy[J]. Semin Nucl Med, 1995, 25(4): 318-325.
- 9 Goggin JM, Hoskinson JJ, Kirk CA, et al. Comparison of gastric emptying times in healthy cats simultaneously evaluated with radiopaque markers and nuclear scintigraphy[J]. Vet Radiol Ultrasound, 1999, 40(1): 89-95.
- 10 杨雪琴, 李炜, 李铀, 等. 心率变异性作为植物神经功能检查方法的探讨[J]. 北京生物医学工程, 1996, 15(2): 65-70.
- 11 周吕, 柯美云, 主编. 神经胃肠病学与运力基础及临床[M]. 北京: 科学技术出版社, 2005: 73-75.

[收稿日期 2012-04-19] [本文编辑 黄晓红 韦颖]

课题研究·论著

抗体基因芯片应用于检测鼻咽癌组织切片蛋白质表达谱的研究

朱有凯, 司勇锋, 肖瑞平, 周向阳, 张政, 韦海明, 黄波, 兰桂萍

基金项目: 广西自然科学基金资助项目(编号: 0728087)

作者单位: 530021 南宁 广西壮族自治区人民医院病理科

作者简介: 朱有凯(1966-), 男, 医学博士, 副主任医师, 研究方向: 肿瘤病理。E-mail: yk_zhu@163.com

[摘要] 目的 研究应用抗体基因芯片检测鼻咽癌组织特异性蛋白质表达谱的新技术方案。方法 利用噬菌体抗体库筛选出抗鼻咽癌的特异性抗体库, 以扩增抗体基因 V-D-J 片段作为标识分子用于制备抗体基因芯片; 通过特异性抗体库与鼻咽癌肿瘤组织结合后, 使标记引物扩增的 V-D-J 序列与抗体基因芯片进行杂交后显示癌组织的蛋白质表达谱, 从而选择性通过免疫组织化学显示其中关键性蛋白质原位表达状况。结果 肿瘤组织结合的抗体滴度可达到 $10^6 \sim 10^8$ 数量级, 标记的 DNA 分子效价约为 $10^{-6} \sim 10^{-8}$, 以该文一次检测 20 个抗体为例, 基因芯片检出有 10~14 个阳性蛋白质表达谱; 免疫组织化学可显示阳性抗体在细胞中的结合部位。结论 以抗体基因芯片为核心的技术方案, 能在组织切片上同时检测含多个蛋白质表达谱, 可以广泛应用于基础研究和临床诊疗过程。

[关键词] 抗体基因芯片; 蛋白质表达谱; 噬菌体抗体库

[中图分类号] R 73 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2012)11-1000-04

doi: 10.3969/j.issn.1674-3806.2012.11.02

Antibody gene chip: a new method applied to detection of protein expression profile in biopsies of nasopharyngeal carcinoma ZHU You-kai, SI Yong-feng, XIAO Rui-ping et al. Department of Pathology, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To develop an antibody gene chip to detect specific protein expression profile of nasopharyngeal carcinoma (NPC) tissues. **Methods** The specific antibody library containing anti-NPC antibodies were selected by using phage anti-body library. The V-D-J fragments as mark DNA molecules were used for preparation of antibody gene chip. After a number of different antibodies of specific antibody library binding the NPC tissues, the mark DNA molecules from the antibodies were amplified by PCR and the results of hybridization between the antibody gene chip and mark DNA molecules revealed protein expression profile of NPC tissues. The expression of key protein in situ of NP cells could be revealed by immunohistochemistry. **Results** The concentration degree of combinative antibodies could be up to $10^6 \sim 10^8$. The mark DNA molecule titer could reach about $10^{-6} \sim 10^{-8}$; Gene chip detected 10 ~ 14 positive antibodies in 20 protein expression profile. The positions of binding antibodies in cells were showed by immunohistochemistry. **Conclusion** The antibody gene chip could detect protein expression profile in biopsies of NPC and could be widely used in basic research and clinical diagnosis and treatment process.

[Key words] Antibody gene chip; Protein expression profile; Phage antibody library

人类基因组计划把人体复杂的生物结构和生命现象还原为数万个基因,开启了蛋白质组时代。蛋白质组 (proteome) 概念由 Wilkins 最先提出^[1],它是指一个有机体的全部蛋白质组成及其活动方式。目前我国蛋白质组研究重基础,轻临床,研究成果无法直接应用于临床,而经济相对落后地区难以开展蛋白质组的研究。在肿瘤临床诊断和治疗上,如果能即时了解数十个关键的肿瘤蛋白质表达状况,对患者个性化治疗将具有十分重要的价值。目前蛋白质组研究采用的技术和设备非常昂贵,难以直接应用到临床肿瘤患者身上。然而,在众多的肿瘤病理学实验室中保存有大量石蜡包埋组织,这些组织是十分重要的肿瘤研究和临床诊疗资源,如能将某种新技术利用这些组织进行蛋白质组学研究,对临床上检测肿瘤组织的特异性蛋白质表达谱是非常有意义的。本课题以鼻咽癌特异性蛋白质表达谱为研究对象,以抗体基因芯片技术为核心,用于检测个性化肿瘤相关性蛋白质组,尤其是检测组织切片蛋白质表达谱的技术研究,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料 (1) 选取 2010 ~ 2011 年本科室保存的 20 例鼻咽癌组织蜡块; (2) M13KO7 噬菌体购自 Amersham Biosciences; (3) M13 antibody 购自 Sino Biological Inc.; (4) 阳离子尼龙膜购自 Salarbio; (5) PCR 反应试剂盒购自天地扬公司; (6) 抗体基因引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成; (7) 生物素标记引物由 Invitrogen (上海) 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 抗体基因芯片制备 噬菌体抗体库经过筛选,获得抗鼻咽癌单克隆抗体,将一定数量的单克隆

抗体组成特异性抗体库 (本组特异性抗体库含 20 种抗体),每种抗体基因经 PCR 扩增后,将纯化 1 μ g PCR 产物 (在 10 μ l TE 缓冲液中) 加热至 95 $^{\circ}$ C 10 min,冰浴 5 min。用微量离心管短暂离心收集液滴,置冰浴。裁一张大小合适的正电荷尼龙膜,用铅笔在膜上画 0.5 cm 的方格网标记 PCR 产物的点样位置。将尼龙膜放在滤纸 (Whatman 3 mm) 上,以 5 μ l 的样品在尼龙膜上点样。点样完成后,将膜稍微晾干,以柠檬酸钠盐水 (SSC) 漂洗 5 次 $\times$ 5 min。固定 DNA: 膜可以置 80 $^{\circ}$ C 真空烤炉 2 h 或者当尼龙膜仍潮湿时,将膜用保鲜膜包裹,将 DNA 面朝下置紫外线透射仪上,紫外线 (280 nm) 照射 3 ~ 5 min。经过上述步骤,制成可用于杂交的抗体基因芯片。

1.2.2 抗体基因标记 按免疫组织化学实验流程,组织切片常规脱蜡后,加入已制备的特异性抗体库,洗涤后加入大肠杆菌 TG1 孵育,取 10 μ l 铺板通过计算菌落以估计结合抗体滴度, TG1 扩大培养提取噬粒 (含结合抗体基因),用生物素标记引物扩增抗体 V-D-J 片段,琼脂糖凝胶纯化后,按倍比稀释测定标记 DNA 效价。

1.2.3 抗体基因芯片与标记 DNA 杂交 将 5 ~ 10 ml Hyb 高效杂交液加入装有抗体基因芯片的杂交袋中, 68 $^{\circ}$ C 预杂交 1 h 弃去预杂交液。将 100 ~ 200 ng 生物素标记的 DNA 在 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min,然后快速在冰浴中冷却 5 min。将标记 DNA 加到 5 ~ 10 ml 68 $^{\circ}$ C 预热的 Hyb 高效杂交液中混匀,加入杂交袋中 68 $^{\circ}$ C 杂交 1 h。倒去杂交液,进行洗膜。室温下, 30 ml SSC 洗涤 2 次, 0.1% 十二 (烷) 基硫酸钠 (SDS) 洗涤 2 次 $\times$ 5 min。65 $^{\circ}$ C, SSC 洗涤 1 次, 0.1% SDS 洗涤 2 次 $\times$ 15 min。加入过氧化物酶标记的链霉素蛋白

10 min, 洗涤后 DAB 显色, 分析结果。选择其中有代表性的抗体做免疫组织化学染色以验证及观察相关蛋白质原位表达状况。

2 结果

2.1 结合特异性抗体滴度 大肠杆菌 TG1 感染噬菌体抗体后获得抗氨苄青霉素抗性, 在含氨苄青霉素平板上菌落数显示抗体滴度范围约为 $10^6 \sim 10^8$ (见图 1)。



图 1 计算菌落数评估结合抗体滴度

2.2 标记 DNA 效价 标记生物素引物扩增抗体基因 V-D-J 片段, 纯化后按 1:10 倍比稀释测定效价约为 $10^{-6} \sim 10^{-8}$ (见图 2)。

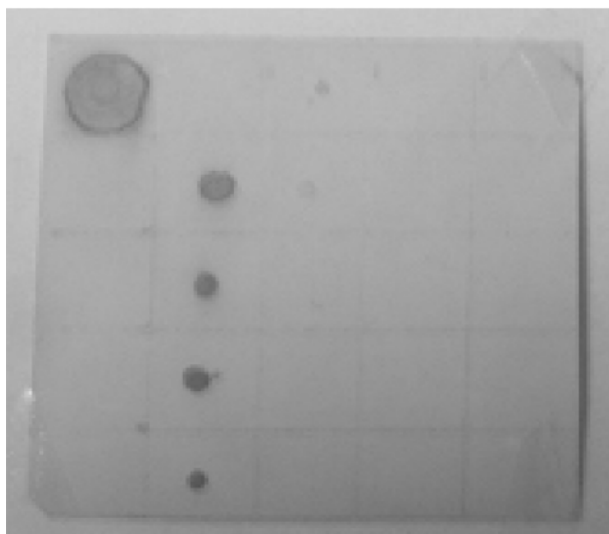


图 2 倍比稀释评估探针效价

2.3 抗体基因芯片杂交及免疫组织化学结果 标记 DNA 与抗体基因芯片杂交, 检出 10 ~ 14 个阳性抗体 (见图 3), 显示 12 个相应蛋白质明显表达; 取其中一个抗体做免疫组织化学, 显示阳性染色位于

细胞浆内 (见图 4)。

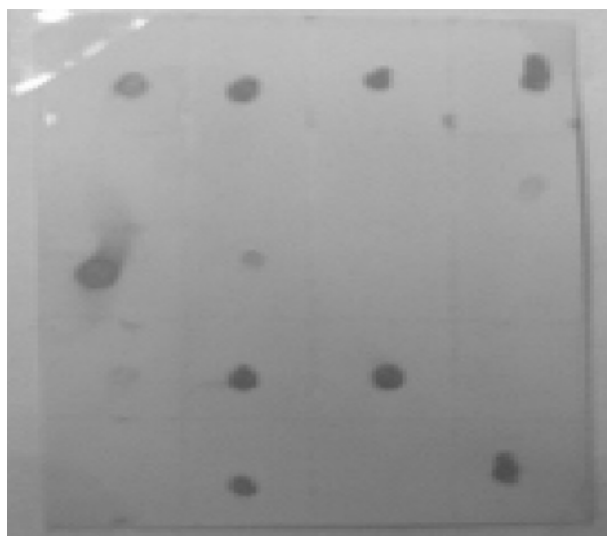


图 3 杂交结果显示蛋白质表达谱

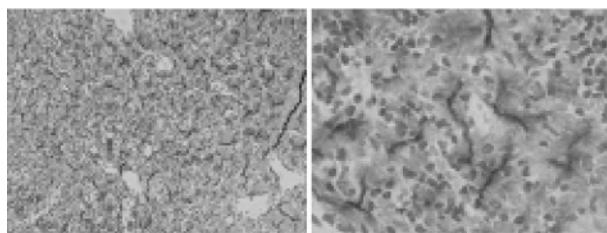


图 4 免疫组织化学显示阳性染色

3 讨论

3.1 蛋白质组研究最基础的问题是蛋白质分离和鉴定。双向凝胶电泳和质谱技术作为蛋白质组研究的两大支柱^[2], 其技术原理是充分利用了蛋白质分子理化性质的差别以区分不同的蛋白质。然而, 蛋白质作为生物大分子仍有许多特性未被开发利用, 例如蛋白质的抗原性在分子作用和分子识别上就具有独特价值。

3.2 每一种蛋白质分子均含有高度特异性可作为分子标签的抗原决定簇,抗体通过识别抗原决定簇从而分离和鉴定蛋白质分子。理论上如果获得大量不同的单克隆抗体, 抗体就能作为蛋白质组研究的良好工具。抗体库技术的发明和发展, 为抗体应用于蛋白质组研究打下坚实基础^[3~5]。目前已有部分学者尝试将抗体库技术应用于蛋白质组研究^[6,7]。抗体基因具有极其复杂的多样性, 尤其是重链 V 基因、D 基因和 J 基因连接部, 既有序列的多样性又有长度的多样性, 是天然的高度特异性和标识性的 DNA 序列, 可作为抗体本身独特的标识分子。基因芯片技术发明后广泛应用于生命科学领域^[8~11], 如果把抗体基因 V-D-J 序列制成 DNA 芯片, 当用大量

不同抗体原位检测新鲜组织切片和石蜡包埋组织切片时,通过 PCR 扩增其中的 V-D-J 序列,然后与抗体基因芯片杂交就能精确地检测出那些抗体参与了反应,从而反映出蛋白质表达状况。

3.3 临床上常常需要原位检测肿瘤蛋白质的表达状况就肿瘤病理学而言,实验室保存有大量石蜡包埋组织,但免疫组织化学一次只能检测 1~2 个蛋白质表达状况,无法同时检测多个蛋白质的表达谱。通过抗体的“中介作用”,我们建立了待测蛋白质分子与相应的抗体基因之间一对一的对应新模式,并以其为基础开发出基于抗体基因芯片的蛋白质表达谱研究模式,即用多个不同抗体同时与肿瘤组织多种待测蛋白质结合后,经 PCR 扩增的标识性 V-D-J 序列与抗体基因芯片杂交,通过杂交结果显示肿瘤组织的蛋白质表达谱,可选择性通过免疫组织化学显示其中某些蛋白质原位表达状况。

3.4 相对于经典的蛋白质组技术和抗体芯片技术而言抗体基因芯片制备过程简单易掌握,可长期保存于普通环境。本技术方案将抗体抗原结合反应、PCR 反应和 DNA 芯片杂交技术有机结合起来,可广泛应用于临床检测患者个性化肿瘤相关性蛋白质表达谱,解决了组织切片原位检测大量蛋白表达的难题;其次是将蛋白质组研究成果直接应用于临床的诊疗过程,是实现疾病个性化治疗的重要前提;批量生产成本进一步降低,对实验室条件要求不高,可以广泛应用于基础研究和临床诊疗过程。

参考文献

1 Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, et al. Progress with

gene-product mapping of the mollicutes: *Mycoplasma genitalium* [J]. Electrophoresis, 1995, 16(7): 1090-1094.

- 2 Yates JR 3rd, Gilchrist A, Howell KE, et al. Proteomics of organelles and large cellular structures [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005, 6(9): 702-714.
- 3 Huse WD, Sastry L, Iverson SA, et al. Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda [J]. Science, 1989, 246(4935): 1275-1281.
- 4 Griffiths AD, Williams SC, Hartley O, et al. Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires [J]. EMBO J, 1994, 13(14): 3245-3260.
- 5 Jespers LS, Messens JH, De Keyser A, et al. Surface expression and ligand-based selection of cDNAs fused to filamentous phage gene VI [J]. Biotechnology (N Y), 1995, 13(4): 378-382.
- 6 Liu B, Huang L, Sihlbom C, et al. Towards proteome-wide production of monoclonal antibody by phage display [J]. J Mol Biol, 2002, 315(5): 1063-1073.
- 7 Huang RP, Huang R, Fan Y, et al. Simultaneous detection of multiple cytokines from conditioned media and patient's sera by an antibody-based protein array system [J]. Anal Biochem, 2001, 294(1): 55-62.
- 8 Marshall A, Hodgson J. DNA chips: An array of possibilities [J]. Nat Biotechnol, 1998, 16(1): 27-31.
- 9 Chang JC, Hilsenbeck SG, Fuqua SA. Genomic approaches in the management and treatment of breast cancer [J]. Br J Cancer, 2005, 92(4): 618-624.
- 10 Subramanya RD, Lucchese G, Kanduc D, et al. Clinical applications of DNA microarray analysis III [J]. Exp Ther Oncol, 2003, 3(6): 297-304.
- 11 Wang Y, Klijn JG, Zhang Y, et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer [J]. Lancet, 2005, 365(9460): 671-679.

[收稿日期 2012-04-19] [本文编辑 刘京虹 吕文娟]

《国外英文生物医学期刊中文译名对照手册》

征订启事

随着医学科学和信息技术的快速发展,医学学术论文写作和医学期刊编辑出版的标准化、规范化的要求越来越严格。目前我国生物医学药类期刊已达 1 400 多种,每年所刊发的学术论文数十万篇,但我们在长期的期刊编辑工作中发现,在众多的医学论文中发生引用、参考、著录、编译外文医学期刊期名不全、不规范、不标准、错漏及缩写语不正确等问题较为普遍,严重影响了论文和期刊的学术质量。因此,为了方便、有效、快捷地使广大的医药卫生科技人员和广大的读者、论文作者、期刊编者全面、正确地掌握和标准、规范使用和参考及著录国外英文期刊及缩写语,我们收集了国外 3 000 多种英文生物医学、药学期刊,对其规范的英文全名、缩写语和中文名称进行了编译,并注明出版地(国),按英文字母顺序进行编排,便于读者、论文作者和期刊编者查阅和对照。本书能有效地帮助广大的医学科研、教学、临床业务人员,在校的博士生、硕士生、本科生,医学期刊编辑人员和图书情报信息人员解决在撰写、修改和编辑科研报告、学位论文、学术论文中查阅、参考外文医学期刊不方便,引用、著录不规范、不标准的问题,以提高广大医学业务技术人员学术论文写作的水平和期刊的编辑学术质量。

本书大 32 开本,彩色封面,精美印刷,由接力出版社出版,定价每册 30 元,由《中国临床新医学》杂志编辑部发行。订阅者请通过邮局直接汇款(书价 30 元,挂号邮寄费 5 元,共计 35 元)到编辑部订购(请在汇单上注明“购手册”)。款到即发货并开具正式发票。

汇款邮编、单位及地址:530021 广西南宁市桃源路 6 号《中国临床新医学》杂志编辑部

收款人:韦颖

• 本刊编辑部 •