

# Discussion of the Applications and Progress of POCT and Thioredoxin Reductase Activity Testing (TrxR) in the Field of Oncology

Ning Xiang<sup>1</sup>, Lei Zhang<sup>2</sup>, Huihui Zeng<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Pharmaceutical Sciences of Peking University, Beijing

<sup>2</sup>Basic Medical School of Peking University, Beijing

Email: bingning.0416@163.com, \*zenghh@bjmu.edu.cn

Received: Mar. 8<sup>th</sup>, 2016; accepted: Mar. 27<sup>th</sup>, 2016; published: Mar. 30<sup>th</sup>, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## Abstract

Malignant tumors are the most common lethal diseases in China. Because of the complexity of carcinogenesis and the lack of specific markers for early diagnosis, so delayed cancer diagnosis and treatment in clinic has a very high mortality rate. Tumor marker has important significance for early screening of carcinoma. However, the current biomarker detections for neoplasm mostly depend on the professional laboratories where it is of high-cost and difficult to extend such assay service in those medically challenged places. Recently point-of-care testing (POCT) has been rapidly developed. Due to its good portability, fast results and easy operation, it is beneficial for cancer screening in human population. Thioredoxin reductase (TrxR) is a novel tumor marker whose expression and activity reflect the extent of abnormal cellular proliferation to some degree. Overall, the combined application of POCT and TrxR activity assay may be a promising strategy for cancer prevention.

## Keywords

Malignant Tumors, Tumor Marker, POCT, TrxR Activity Testing

# 浅谈POCT及硫氧还蛋白还原酶活性检测在肿瘤领域的应用与进展

相宁<sup>1</sup>, 张磊<sup>2</sup>, 曾慧慧<sup>1\*</sup>

\*通讯作者。

<sup>1</sup>北京大学药学院, 北京

<sup>2</sup>北京大学基础医学院, 北京

Email: bingning.0416@163.com, \*zenghh@bjmu.edu.cn

收稿日期: 2016年3月8日; 录用日期: 2016年3月27日; 发布日期: 2016年3月30日

## 摘 要

恶性肿瘤已成为我国最常见的导致死亡的疾病。由于病因与发病机制复杂, 且缺乏早期诊断的特异性指标, 导致诊断和治疗滞后, 病死率极高。肿瘤标志物对于肿瘤的早期发现具有重要的提示意义, 但目前肿瘤标志物检测大多依赖于专业实验室, 成本高, 检测周期长, 且在医疗资源匮乏地区难以推广。近期新兴的POCT检验模式发展迅猛, 因其设备便携, 获得结果迅速且操作简单, 故有利于人群中肿瘤标志物的筛查。硫氧还蛋白还原酶(TrxR)活性检测, 是一种新型的肿瘤标志物检测, 其在体内的表达和活性水平在一定程度上反应了体内细胞的异常增生程度。因此, POCT和TrxR活性检测的联合应用将有望成为癌症预防的新策略。

## 关键词

恶性肿瘤, 肿瘤标志物, POCT, 硫氧还蛋白还原酶(TrxR)活性检测

## 1. 引言

近年来, 全球癌症的发病率和死亡率不断上升。然而, 由于其病因与发病机制复杂, 且缺乏早期诊断的特异性指标, 使其诊断和治疗滞后, 病死率非常高。随着基础研究的发展, 越来越多提示早期肿瘤存在的特异性标志物被发现, 使得肿瘤的早期发现成为可能。其中, 硫氧还蛋白还原酶(TrxR)活性检测便是其中之一, 它能够在肿瘤细胞形成的早期即可检测到体内肿瘤形成的共有特性-异常增生的活跃程度, 进而起到早期肿瘤预警的作用。然而, 目前癌症的检测大多依赖于大型医院的专业实验室, 耗时长, 价格昂贵, 且在医疗资源匮乏地区难以推广, 而近期新兴的床旁检验(point-care-of-testing, POCT)技术, 是检验医学发展的新模式, 具有微型化、高效率、检验周期短、标本用量少等优点, 满足了医生和患者时间上的需求且易在医疗资源滞后地区开展[1]。因此, POCT技术与TrxR检测的联合应用, 将不仅实现肿瘤的早期检测, 且可以普及到医疗资源匮乏的地区, 方便、快捷, 从而真正地造福于人类。

## 2. POCT 技术

医学检验技术飞跃性的发展, 使得许多理论与概念应运而生, POCT (point of care testing)就是其中之一。所谓的 POCT (point of care testing), 是指在采样现场或病人旁边, 利用便携式分析仪器及配套试剂快速得到检测结果的一种检测方式, 称为“床旁检测”或“即时检验” [2]。大家所熟悉的血糖仪, 就属于最早的一种 POCT 设备, 以及我们经常听说的尿液干化学和妊娠试验等都属于 POCT, 可见 POCT 技术已逐步渗透我们的生活, 成为检验医学发展的一种趋势。

POCT 作为一种新的检验手段, 它是随着人们健康理念的转变以及免疫反应和分子生物技术引进等医学模式的改变而发展起来的。其特点是即时测定、标本用量少、标本周转时间(TAT)短、仪器小型、操作简单、结果报告即时等, 且结果与中心实验室具有可比性, 医生可用它做出快速诊断, 为临床急重症患者的即时诊断及治疗提供了有利条件[3]。这顺应了当今社会高效、快节奏的工作方式, 满足了医师和

患者对时间上的要求,实现了患者尽早诊断和治疗、积极进行自我观察和干预的愿望,也给传统的医疗模式带来新的机遇。因此,POCT 在临床应用中得到了迅速的发展,成为临床检验和急诊检验工作中令人瞩目的热点和新的工作模式。

### 3. 基于检测对象的 POCT 分类

近年来,POCT 的发展主要体现在便携式分析仪器如酶联免疫、生物传感器、生物芯片、纳米技术等现代分析技术的大量引入及 POCT 检验在应用范围上的拓宽,下面将根据检测对象介绍一下 POCT 在血液分子诊断中的近期发展状况:

#### 3.1. 蛋白质检测

众所周知,蛋白包含大量的生物学信息和功能,从酶促反应、激素的合成到代谢平衡的维持和组织的修复[4],都需要蛋白质的参与。临床上,某些蛋白质生物标志物的水平直接反映了疾病的进程,常被认为是临床疾病诊断最方便的来源之一。血液中含有大量的蛋白质,其获取方便、快速、且损伤小,因此成为临床疾病检测青睐的生物标志物。下面讲一下基于蛋白质的临床检测法。

##### 3.1.1. 基于 ELISA 的蛋白质检测法

目前,大部分血液蛋白分析方法是基于酶联免疫吸附法(ELISA),并常被作为临床检测的金标准。但是,传统的 ELISA 法,样品往往需要预处理、设备较大且需要精密的读取装置,检测费时又费力,尽管许多基于 ELISA 的新技术发展起来,但其应用在 POCT 诊断上仍然面临着灵敏度、重复性、定量性、便携性、操作速度及结果读取的清晰和成本的降低等挑战。

1987 年引入的侧流测定法(LFA),结合了薄层纸色谱和 ELISA 的原理,避免了样品反复洗涤的繁琐预处理,使一滴血的血浆成分在几分钟即可分离出来,成为当时最成功的商业技术[5]。最近新开发的微流体芯片(mChip)技术,简化了 ELISA,需要很少的设备,即可快速、高特异性的完成样本的分析。如基于该设备的艾滋病毒(HIV)的诊断,只需要 1 ml 血液,20 分钟内即可完成样本分析[6]。缺点是灵敏度低、结果半定量且吞吐量低。

另外,基于灵敏度提高而发明的数字 ELISA 法,可检测到血清中低至 fmol 浓度的蛋白;另一种提高灵敏度的方法是将新的信号放大法引入到 ELISA 分析中,如等离子 ELISA (plasmonic ELISA),其原理是通过过氧化氢酶控制金纳米颗粒(AuNPs)生长进而使其颜色产生变化,由此实现了血液中蛋白质的超灵敏的检测[7]。另外,基于 ELISA 平台的磁信号(GMR)传感器,可避免检测磁背景信号,因此产生较低的噪声信号[8],有效的提高了灵敏度,使血清中蛋白质的检测限低至 aM 级别。但是,这些技术在操作上费时且需精密的读取仪器。

临床研究证明,多蛋白的定量测量能够提供更精确的诊断结果,而光刻 mChips 在多重蛋白分析上展现出强大的应用能力[9]。如最近开发的综合性血液条码芯片(IBBC),是将显微荧光条形码作为血液多重分析报告的信号[10],但定量测量仍需精密的仪器。而由复容积条形码芯片(V Chip)集成的 ELISA,其通过测量 mChip 上产生的氧的体积实现了生物标记的即时和即视定量[11],无需额外的仪器、数据处理或图形绘制即可产生可视的条形码,且可重复、定量地对目标蛋白质生物标志物进行测定,灵敏度可通过该装置中存入的多级统一铂片被放大。在未来,V Chip 技术可能会通过整合样品预处理过程而得到广泛的应用。

##### 3.1.2. 不基于 ELISA 的蛋白质检测法

全血清分析的传统临床方法是电泳法结合质谱法。但该方法的灵敏度和定量性在临床应用上仍存在

着问题,因此,有必要开发一些用于全血清分析的优化技术。

介孔二氧化硅薄膜(MPS)的发现,加强了血清中循环低分子量蛋白质(LMWP)的富集作用,但捕获的 LMWP 需通过质谱(MS)进行检测和分析[12],POCT 诊断中 MS 的使用过于昂贵;最近,利用 GFP 和 AuNPs 之间静电相互作用而发明的新的传感平台 GFP-AuNPs,已用于血清蛋白质的检测[13],其具有足够低的检测限,故可以在 POCT 诊断中应用。这些测定法即快速且不需要任何洗脱步骤。

### 3.2. 核酸检测

核酸是细胞内遗传信息的载体,少量的存在于健康者和患病者的血清中[14]。血液中核酸的提取和分析为遗传疾病状态的检测提供了一种相对非侵入性、高患者兼容性方法。目前,核酸的检测方法主要基于 PCR,这局限于实验室,且成本昂贵、仪器笨重。尽管微流体设备为血液中核酸的快速纯化提供了可能,但目前的核酸检测仍面临着一个巨大的挑战:如何将核酸的预处理以一种廉价、强大和用户友好的模式整合到核酸的检测中。

#### 3.2.1. DNA 的测定

来自凋亡或坏死细胞的循环 DNA,被认为是人类疾病多样化的一种非侵入性生物标记物。片段大小的分析有望在癌症和产前诊断中确定 DNA 来源。目前开发的微流体单分子光谱技术( $\mu$ CICS),可用于血清中 DNA 生物标记的直接分析[15]。这一新技术不需要 DNA 分离或酶促扩增这些附加步骤,就可对体积  $< 1\text{pl}$  的血清中循环 DNA 进行单步分析和量化。

另外,通过血清样品确定 DNA 突变是癌症治疗的另一个重要的方面。从癌症患者的血清中提取的循环 DNA 总是包含着肿瘤的特异性突变。标记扩增子深度排序(TAm-Seq)的新方法,是利用循环 DNA 的单拷贝体进行扩增和排列大型基因组,其具有较高的灵敏度和特异性,能对突变率低至 2% 的 5995 个核苷酸进行筛选检测。

甲基化的 DNA 是癌症和其他遗传性疾病早发现的另一有前途的生物标志物,且甲基化中组合的改变比单一改变表现出与特定癌症更强的关联。最近,基于水溶性阳离子共轭聚合物(CCP)的荧光共振能量转移法被开发出来,并用于结肠癌患者细胞 DNA 甲基化水平的定量测定[16]。这种方法在鉴别分析和累积检测中显示出较高的精确度和灵敏度。

#### 3.2.2. RNA 分子的测定

mi RNA 是调节性 RNA 小分子,在癌症患者中常常失调,故有望成为用于癌症分类和预后的生物标志物[17]。但是,高灵敏度(至少 fmol 级)的检测血液中的 mi RNA 仍面临巨大的挑战。最近开发的具有低检测限和宽动态范围的三模式电化学传感器(HPD-SENS),可用于 mi RNA 的定量检测,检测限低至 5 amol;另外,纳米技术也被引入到高敏感传感器中用于 mi RNA 的检测[18],如 DNA 的纳米结构提高了电化学 mi RNA 传感器(EMRS)的灵敏度,使 mi RNA 的检测浓度低至 amol 级。另外,开发的基于  $\alpha$ -溶血素蛋白的纳米孔传感器,已用于检测肺癌患者血浆中的 miRNA。

### 3.3. 其他类型生物分子的检测的 POCT 技术

血液中其他类型的生物分子大都来自代谢过程或药物的使用。代谢物的水平,包括激素和血液中的化学物质,往往是疾病的指标,而对于血液中的成瘾药物如可卡因的存在,则常被用于发现和防止药物滥用和非法贩运的监测[19]。由于小尺寸或类似的化学结构,识别这些分子的市售抗体常常在免疫测定中表现出高的交叉反应,故现有的检测这些小分子的方法往往缺乏足够的灵敏度或特异性。

血糖测量对于糖尿病人将血糖控制在正常的生理范围内至关重要。目前使用的血糖仪主要依赖电化

学信号的测量。最近开发出来的基于石墨烯固有过氧化酶活性的石墨烯葡萄糖传感器[20],使血糖的测量变得简单、低廉,并且有较高的灵敏度和选择性。其他的像碳纳米管或石墨-血红素络合物,也表现出过氧化酶活性,并且可用于铜离子、脱氧核糖核酸、溶菌酶和癌细胞的检测[21]。

类固醇类雌激素通常用来确诊乳腺癌的患病风险或乳腺癌抗雌激素治疗的疗效监测[22]。近期开发的小巧、高效和直观的数字微流体(DMF)法已用于小至 1 ml 的血样中雌激素的分析,该方法可用于大多数多步样本处理程序及血液或血清样品的分析[23]。

一氧化氮(NO)是一种由 NO 合成酶合成的亚稳定的自由基,参与许多重要的生理过程,如伤口愈合、血管生成和免疫反应[24]。新研发的基于 NO-选择性干凝胶聚合物的微流体安培传感器装置已用于小血液样本(250 $\mu$ l)中 NO 检测,这一安培传感器显示出优良的选择性和较高的灵敏度,在磷酸盐缓冲液和血液中的检测限分别达 840 pM 和 472 nM。

### 3.4. 基于分子分析的细胞检测

原发肿瘤部位脱落下来的存在于血液中的循环肿瘤细胞(CTCs),为了解癌症发病机制提供了难得的模型系统。这种分子信号可显著提高临床医生对癌症的诊断和控制能力。CTCs 的数量非常少(平均 107~109 血细胞中存在 1 个),因此捕获非常困难,故临床应用中,需要开发像非侵入性“液体活检”那样的具有高捕获效率、灵敏度以及较低成本的新平台。

近期的微流控技术、免疫检测和分子分析的发展逐渐满足了这一要求。如开发并用于全血样品中 CTC 计数的商业化的筛选系统(CellSearch);另外,免疫芯片,则是一种广泛使用的细胞分离方法,它借用磁力将癌细胞和标记的磁性颗粒从未标记 RBC 和 WBC 中分离出来的;除了免疫标记分离法,无标记的微流体法也开始应用到细胞的分离中,如基于细胞大小的微芯片,已开发出来并用于血细胞中癌细胞的分离,其是根据癌细胞的物理性质如大小、形状、密度和不同细胞类型的变形性等差异进行分离[25];其他无标记的分离技术如介质分离,则是利用癌细胞的介电性能达到分离目的的[26]。

另外,一些新技术如荧光原位杂交(FISH)、RT-PCR、定量 RT-PCR (QRT-PCR)以及数字 PCR 等也已用于肿瘤细胞的分子分析,为癌症的治疗策略提供诊断和预后信息。

## 4. POCT 技术的临床研究及应用

目前从国家政策到市场环境,我国的 POCT 产业已具备良好成熟的发展环境。如 2011 年正式启动的 863 计划生物和医药技术领域“体外诊断技术产品开发”重大项目中,临床即时检测分析(POCT)方面,已研制出全自动血小板分析仪、POCT 定量发光免疫分析仪和干化学检测仪,并完成国内首款冷光源小型 POCT 糖化血红蛋白检测仪器原理实验和样机等产品,共获得 SFDA 注册证书 28 项、CE 认证 1 项[27];当前 POCT 新技术还在不断涌现,以胶体金免疫层析技术为代表的定性技术已经在临床和生物应急检测领域得到广泛应用,以转换发光物质为基础的定量 POCT 检测技术也不断出现,为定量 POCT 检测带来了曙光。例如,三诺生物目前正在完成智能血糖仪和配套血糖试条、尿微量白蛋白试条、血尿酸双功能测试仪和测试试条的研发和产业化生产;达安基因、深圳理邦仪器、金域检验、三诺生物、广州万孚等国内企业也早早在 POCT 产业布局,其中深圳理邦仪器公司开发了具有自主知识产权的 POCT 系统及测试系统,公司的首款 POCT 新产品已经在 2012 年上半年拿到欧盟的 CE 认证,并出口海外;广州万孚生物技术有限公司建立了成熟的纳米金标记技术平台、彩色胶乳标记技术平台、单克隆抗体技术平台、基因工程重组技术平台和小分子半抗原修饰技术平台,公司是我国传染病系列检测产品注册证书最全的制造商,且其药物滥用检测系列产品在公安系统及征兵体检领域具有较高的认知度。目前,国内公司争夺最激烈的细分领域集中在心脏疾病、肿瘤、感染领域,而随着 POCT 技术的发展,及国内老龄化社会

的到来,患慢性病(糖尿病、冠心病、肝肾病)的人愈来愈多,中高收入者及需长期监护人群不断增多,我国 POCT 产品有望迎来爆发式增长。

最初,POCT 主要用于血糖和早期妊娠的检测,但随着检测技术的发展,POCT 更多的应用于儿科疾病、心血管疾病[28]、内分泌疾病、妊娠期检测、肿瘤标志物、毒品/酒精检测、过敏原检测等方面。例如全定量免疫荧光检测仪用于糖尿病患者糖化血红蛋白与尿微量白蛋白等指标的检测,有助于糖尿病肾病早期发现,有利于患者病情的评估与长期监测;POCT 在心血管疾病诊治中的运用可使 AMI 患者得到及时地诊断和治疗:如特异性血清早期标志物肌钙蛋白 I(cTnI)、肌红蛋白(Mb)、肌酸激酶同工酶 MB(CK-MB)、D-二聚体、脑钠肽(BNP)等可通过金标定量检测仪、全定量免疫荧光检测仪、快速 CRP 检测仪等进行快速检测;而诊断用蛋白芯片技术、免疫金标记技术相关 POCT 的运用,可以让那些不具备细菌培养条件的基层医院、民营诊所、社区保健所也能快速明确地进行微生物的快速检测,快速得到诊断结论,避免了长时间等待等诸多不便;ICU 重症监护病房病人病情发展特别快,检测需要快速准确,POCT 可以很好的适应这种需求,如用于体外监测的电化学感应器,可周期性地检测患者的血气、电解质、血细胞比容和血糖。因此,与传统的临床检测相比,POCT 有着不可替代的技术优越性和市场地位。

## 5. POCT 在肿瘤领域应用中的一些问题

肿瘤患病率越来越高,而传统检测手段如组织活检、细胞形态学检测及影像学检测等,有一定创伤性且发现时多已处于晚期,病死率较高。随着基础研究的深入,越来越多特异性高的 TM 被发现并应用于临床,但传统的 TM 检验模式依赖于中心实验室,检测周期长且很少普及无症状的肿瘤患者。POCT 作为一种新的检验模式,因即时检测、仪器小型、操作简单、标本用量少等优势而在 TM 检测领域得到了快速的发展和运用。

近年来,POCT 因其多重优点而迅速发展,但其在 TM 检测中仍然存在着一些亟待解决的问题。首先,TM 种类繁多,每一种标志物的理化特性不一定都适应于 POCT 法检测,需要进一步的研究和验证;其次,生物标志物可出现在肿瘤细胞内或细胞外,如果是前者,细胞需要被溶解以释放生物标志物,这就需要进行分析前预处理或者开发更敏感的 POCT 检测设备;第三,POCT 的操作者通常是非专业人员,操作失误导致的错误结果会产生严重后果,所以需要定期对非检验操作人员进行定期培训;最重要的是,POCT 技术检测 TM,建立统一标准的参考值以及独立的 POCT 质量评价和控制体系至关重要,这需要大量临床资料的统计学研究以及与中心实验室的比对。尽管很多 POCT 检测平台也在不断的进行改进,但还需要进一步完善,尽快制定出台有关 POCT 技术准入、全面规范的质量管理,加强医生、护士及其相关人员培训的管理办法或指南,保证检测结果更加实际、客观、可靠[29],以使 POCT 技术健康的造福于社会。

## 6. 硫氧还蛋白还原酶(TrxR)及其活性检测在临床中的应用

### 6.1. 硫氧还蛋白还原酶(TrxR)

硫氧还蛋白系统是人体内非常重要的氧化还原平衡调节系统,由硫氧还蛋白(Trx)、硫氧还蛋白还原酶(TrxR)和 NADP 组成。它在机体中发挥着重要的生理功能,包括机体氧化还原调节和抗氧化防御、细胞生长、凋亡调节和器官发育调控等[30] [31],而 TrxR 是这一系统中重要且唯一的还原酶。研究表明,Trx 系统与肿瘤的发生、发展、转移、浸润具有密切的关系。一方面,Trx 系统通过氧化还原调节作用抑制肿瘤发生。另一方面,Trx 系统在肿瘤细胞的生长、进展和转移中发挥作用。Trx 系统对于肿瘤表现出的双面性,可能取决于肿瘤发展阶段和组织特点。在肿瘤早期,Trx 系统通过清除体内多余的 ROS 对抗氧化损伤,抑制细胞恶性增生,降低癌变风险。在肿瘤细胞中,过表达的 Trx、TrxR 促进细胞增殖,抑

制细胞凋亡并且加速血管生成, 导致异常增生和凋亡障碍, 使细胞发生恶性转化。TrxR 在这一过程中起到了关键性的作用。

许多研究表明, TrxR 在许多肿瘤细胞中普遍高表达、高活性, 并且大量研究表明 TrxR 参与刺激肿瘤细胞增殖、抑制肿瘤细胞凋亡、促进肿瘤耐药发生等事件, 如细胞核的 Trx-TrxR 表达和凋亡的抑制程度有关, 且酶的表达量越高, 凋亡抑制越明显[32]。研究还表明, TrxR 在非小细胞肺癌、肝癌, 乳腺癌、甲状腺癌、结直肠癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌等多种人原发性恶性肿瘤中高表达[33]。因此, TrxR 成为肿瘤预防和治疗新靶点, 并受到越来越多的关注。

## 6.2. 硫氧还蛋白还原酶(TrxR)活性检测原理

TrxR 可以催化还原 5, 5-二硫代双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)分子中二硫键, 使其还原为两分子的黄色产物 5-巯基-2-硝基苯甲酸(TNB), 产物在 405~412 nm 处有强烈的紫外吸收, 可通过检测 TrxR 单位时间内催化 DTNB 的量来反映该酶活性。但生物样本(如血液, 组织匀浆)的复杂体系中, 很多其他生物活性物质可以将 DTNB 还原。因此, 对于复杂样品中 TrxR 活性的测定, 通常采用特异性 TrxR 抑制剂抑制该酶活性, 然后通过背景扣除法测定生物样本中 TrxR 的活性。测定程序分为两步骤: DTNB 直接测定样品中总催化活性; 用特异性 TrxR 抑制剂掩蔽 TrxR 催化活性后, 用 DTNB 测定样品中剩余催化活性。然后两者测定的差值即反映了 TrxR 特异性催化活性。

## 6.3. TrxR 活性检测在临床中应用情况

TrxR 活性检测, 是由本实验室基于 TrxR 与肿瘤的发生、发展、转移、浸润具有密切的关系而研发的一项专门用于肿瘤预警和治疗监测的新技术。通过受试者体内 TrxR 活性(即体内异常增生酶的活性)的检测, 结合 TrxR 检测指标来综合评价受试者罹患癌症的风险或癌细胞活跃程度, 从而起到癌症早期预警的作用。TrxR 检测作为肿瘤生物标志物的创新检测技术已通过国家临床检验中心评价, 作为 2013 新增检测项目纳入 2013 年医疗机构临床检验项目目录当中, 是国家目录 1462 个项目中的 97 个新项目之一。

相比于目前临床常用的肿瘤标志物, TrxR 检测对大多数肿瘤均具有较高的灵敏度(82.1%), 以及肿瘤诊断的广谱性, 且能够在肿瘤细胞形成前的异常增生阶段即能够检测到体内的增生活性, 因此, 作为一种新型的可以定量表征异常增生活跃程度的肿瘤标志物, 其广谱、高效、无创、准确、超早期的特点, 使得 TrxR 检测在肿瘤早期筛查、辅助肿瘤临床治疗监测、评估预后中都具有非常高的应用价值。

目前, TrxR 活性检测作为肿瘤预警监测的生物标志物, 已在临床实践中得到应用和验证。如李方超[34]等通过酶联免疫分析方法检测 50 例肺癌患者及 50 例健康体检者血浆中 TrxR 的活性表达, 结果显示肺癌患者血浆中 TrxR 活性明显高于健康体检者, 且差异有统计学意义。马微微、周明[35]等通过对 150 例肺癌患者及 667 例的健康体检者血浆中 TrxR 活性进行检测, 结果显示: 肺癌患者血浆中 TrxR 活性高于健康体检者, 差异有统计学意义, 且 92.6% 的肺癌患者术后血浆 TrxR 活性明显降低, 这表明 TrxR 可以成为肺癌早期诊断的潜在生物标志物; Cadenas C 等人的研究证明在乳腺癌中 TrxR 过量表达[36], 其活性与细胞异常增殖密切相关, Yanran F [37]等人对 128 例乳腺癌患者及 667 例健康人血浆 TrxR 活性表达的研究表明: 乳腺癌患者的 TrxR 水平明显高于正常人, 差异有统计学意义, 且 TrxR 活性值水平与影像学评价结果具有较高的一致性, 这表明 TrxR 作为肿瘤标志物可用于乳腺癌的疗效监测及评判, 对于乳腺癌的早期检测也有一定意义。

基于 TrxR 活性检测而开发的“TrxR 超早期防癌体检”项目已被广泛应用于肿瘤早期筛查及临床监测中。目前该项目已在武汉、北京、天津、上海、浙江、宁波等地得到广泛的推广应用。

## 7. 结语和展望

POCT 作为一种新的检验模式正在迅速发展, 尤其是生物传感器技术、蛋白芯片、纳米技术等先进技术的引入, 更是推动了 POCT 的发展, 使越来越多的生物学诊断技术向 POCT 领域发展, 不仅提高了检测灵敏度和特异性, 而且进一步加强了检测稳定性、加快反应速度, 小型化、结果读取清晰等。TM 对于肿瘤的早期发现至关重要, 蛋白、基因的过表达、低表达或者突变, 以及 DNA、microRNA、循环肿瘤细胞(CTCs)及蛋白修饰等分子标志物均可在肿瘤的早期诊断中发挥作用, 但是, 传统的肿瘤标志物的检验模式依赖于中心实验室, 检测周期长且很少普及无症状的肿瘤患者。因此, 筛选鉴定出新的高特异性、敏感度的 TM, 并以此为基础研发新的 POCT 方法, 将具有巨大的市场前景。TrxR 检测作为一种新的广谱肿瘤标志物检测, 理论上可覆盖所有肿瘤异常增生水平的检测, 具有较高的灵敏度和特异性, 而且能够在肿瘤细胞形成前的异常增生阶段即可检测到体内的异常增生活性, 可用于肿瘤的早期筛查和疗效监测, 尤其是对于目前临床上存在诊断空白的恶性肿瘤如甲状腺癌、宫颈癌、喉癌、鼻咽癌等起到一个很好地即时筛查和疗效监测作用。因此, 如果将 POCT 技术和 TrxR 检测联合应用, 将有望实现肿瘤早期的快速、随时、便捷的预警检测, 并可以普及到医疗资源匮乏的地区, 真正的造福于人类。

此外, POCT 技术也面临着不小的挑战, 这关系到患者的健康和生命。首先, POCT 的每一次检测都是相对独立的, 缺乏无完善的质量控制体系[38], 故检测结果的准确性难以保证; 其次, POCT 操作者无法进行统一培训导致仪器准确率降低; 第三, 因其应用的特殊性, 使得 POCT 仪器缺乏统一的质控措施及操作标准; 第四, POCT 设备更新较快, 所用试剂均为各个厂家专用, 在一定程度上增加了使用成本等。鉴于此, 国家及各级医疗管理机构、企业等应加强对 POCT 产业的管理革新, 如加强对 POCT 质量控制、操作人员特别是非专业人员的培训; 其次, 检测过程和结果应定时接受室内质控的监督、室间质评和盲点现场考核[39], 有力地保证 POCT 检测的质量; 第三, 生产企业应积极开发足够智能化、自动化、可靠性更高的仪器和试剂, 使 POCT 检测结果的准确性与大型仪器等效; 另外, 尽管纳米技术和生物技术的发展已明显改进了分子诊断的敏感性和特异性, 但这些改进都伴随着成本和便携性的牺牲, 因为它们往往需要费力的样品前处理及精密的读取仪器, 而 mChips 具有相当大的吞吐量、便携性和高水平的集成能力, 因此, 如果能够样品制备和先进纳米/生物技术被引入的话, 它们将满足的 POCT 分子诊断的要求, 同时, 设备成本可通过使用便宜的材料、小体积的试剂和大规模生产得到降低。在未来, 技术的低成本、输送能力、用户友好性以及严格的质量保证体系和管理规范将是 POCT 技术发展的主要方向。

## 参考文献 (References)

- [1] 李福刚, 顾敏晔, 薛汉阳, 等. 浅谈 POCT 技术在检验医学中的应用和发展趋势[J]. 中华检验医学杂志, 2012(35): 1212-1219.
- [2] Price, C.P., John, A. and Hicks, J.M. (2004) Point-of-Care Testing. AACC Press, Washington DC.
- [3] 董家书, 蒋丽君. POCT 的发展及应用现状[J]. 医学研究杂志, 2011, 29(10): 38.
- [4] Yildiz, F. (Ed.) (2010) Advances in Food Biochemistry. CRC Press.
- [5] Warsinke, A. (2009) Point-of-Care Testing of Proteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **393**, 1393-1405. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-008-2572-0>
- [6] Chin, C.D., et al. (2011) Microfluidics-Based Diagnostics of Infectious Diseases in the Developing World. *Nature Medicine*, **17**, 1015-1138. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2408>
- [7] de la Rica, R. and Stevens, M.M. (2012) Plasmonic ELISA for the Ultrasensitive Detection of Disease Biomarkers with the Naked Eye. *Nature Nanotechnology*, **7**, 821-824. <http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2012.186>
- [8] Gaster, R.S., et al. (2009) Matrix-Insensitive Protein Assays Push the Limits of Biosensors in Medicine. *Nature Medicine*, **15**, 1327-1332. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2032>
- [9] Fan, R., et al. (2008) Integrated Barcode Chips for Rapid, Multiplexed Analysis of Proteins in Microliter Quantities of



- Blood. *Nature Biotechnology*, **26**, 1373-1378. <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.1507>
- [10] Qin, L.D., *et al.* (2009) Self-Powered Microfluidic Chips for Multiplexed Protein Assays from Whole Blood. *Lab Chip*, **9**, 2016-2020. <http://dx.doi.org/10.1039/b821247c>
- [11] Song, Y., *et al.* (2013) A Multistage Volumetric Bar Chart Chip for Visualized Quantification of DNA. *Journal of the American Chemical Society*, **35**, 16785-16788. <http://dx.doi.org/10.1021/ja4085397>
- [12] Rosi, N.L. and Mirkin, C.A. (2005) Nanostructures in Biodiagnostics. *Chemical Reviews*, **105**, 1547-1562. <http://dx.doi.org/10.1021/cr030067f>
- [13] Liu, X., *et al.* (2008) A One-Step Homogeneous Immunoassay for Cancerbiomarker Detection Using Gold Nanoparticle Probes Coupled with Dynamic Light Scattering. *Journal of the American Chemical Society*, **130**, 2780-2782. <http://dx.doi.org/10.1021/ja711298b>
- [14] Lam, B., *et al.* (2013) Solution-Based Circuits Enable Rapid and Multiplexed Pathogen Detection. *Nature Communications*, **4**. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms3001>
- [15] Liu, K.J., *et al.* (2010) Decoding Circulating Nucleic Acids in Human Serum Using Microfluidic Single Molecule Spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, **132**, 5793-5798. <http://dx.doi.org/10.1021/ja100342q>
- [16] Yang, Q., *et al.* (2012) Detection and Differential Diagnosis of Coloncancer by a Cumulative Analysis of Promoter Methylation. *Nature Communications*, **3**.
- [17] Chen, X., *et al.* (2008) Characterization of microRNAs in Serum: A Novel Class of Biomarkers for Diagnosis of Cancer and Other Diseases. *Cell Research*, **18**, 997-1006. <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2008.282>
- [18] Dong, H., *et al.* (2013) MicroRNA: Function, Detection, and Bioanalysis. *Chemical Reviews*, **113**, 6207-6233. <http://dx.doi.org/10.1021/cr300362f>
- [19] Gubala, V., *et al.* (2011) Point of Care Diagnostics: Status and Future. *Analytical Chemistry*, **84**, 487-515. <http://dx.doi.org/10.1021/ac2030199>
- [20] Song, Y., *et al.* (2010) Label-Free Colorimetric Detection of Single Nucleotide Polymorphism by Using Single-Walled Carbon Nanotubeintrinsic Peroxidase-Like Activity. *Chemistry—A European Journal*, **16**, 3617-3621. <http://dx.doi.org/10.1002/chem.200902643>
- [21] Song, Y., Xu, C., Wei, W.L., Ren, J.S. and Qu, X.G. (2011) Light Regulation of Peroxidase Activity by Spiropyran Functionalized Carbon Nanotubes Used for Label-Free Colorimetric Detection of Lysozyme. *Chemical Communications*, **47**, 9083-9085. <http://dx.doi.org/10.1039/c1cc13279b>
- [22] Mousa, N.A., Jebrail, M.J., Yang, H., Abdelgawad, M., Metalnikov, P., Chen, J., Wheeler, A.R. and Casper, R.F. (2009) Droplet-Scale Estrogen Assays in Breast Tissue, Blood, and Serum. *Science Translational Medicine*, **1**, 1ra2. <http://dx.doi.org/10.1126/scitranslmed.3000105>
- [23] Shih, S.C., Yang, H., Jebrail, M.J., Fobel, R., McIntosh, N., Al-Dirbashi, O.Y., Chakraborty, P. and Wheeler, A.R. (2012) Dried Blood Spot Analysis by Digital Microfluidics Coupled to Nanoelectrospray Ionization Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, **84**, 3731-3738. <http://dx.doi.org/10.1021/ac300305s>
- [24] Hunter, R.A., Privett, B.J., Henley, W.H., Breed, E.R., Liang, Z., Mittal, R., *et al.* (2013) Microfluidic Amperometric Sensor for Analysis of Nitric Oxide in Whole Blood. *Analytical Chemistry*, **85**, 6066-6072. <http://dx.doi.org/10.1021/ac400932s>
- [25] Zhang, W., Kai, K., Choi, D.S., Iwamoto, T., Nguyen, Y.H., Wong, H., *et al.* (2012) Microfluidics Separation Reveals the Stem-Cell-Like Deformability of Tumor-Initiating Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, 18707-18712. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1209893109>
- [26] Gascoyne, P.R., Noshari, J., Anderson, T.J. and Becker, F.F. (2009) Isolation of Rare Cells from Cell Mixtures by Dielectrophoresis. *Electrophoresis*, **30**, 1388-1398. <http://dx.doi.org/10.1002/elps.200800373>
- [27] 阮晓东. POCT: 体外诊断新突破[J]. 新经济导刊, 2013(7): 65-68.
- [28] 刘存午, 贾建勋. POCT 在社区卫生机构中的应用[J]. 中国医疗器械杂志, 2015, 39(2): 149-152.
- [29] 李智. POCT 技术在临床应用的现状与问题[J]. 中华检验医学杂志, 2012, 35(12): 1062-1065.
- [30] Passegue, E. and Wagner, E.F. (2000) JunB Suppresses Cell Proliferation by Transcriptional Activation of p16<sup>INK4a</sup> Expression. *The EMBO Journal*, **19**, 2969-2979. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/19.12.2969>
- [31] Davis, R.J. (2000) Signal Transduction by the JNK Group of MAP Kinases. *Cell*, **103**, 239-252. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00116-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00116-1)
- [32] Smart, D.K., Ortiz, K.L., Mattson, D., Bradbury, C.M., Bisht, K.S., Sieck, L.K., *et al.* (2004) Thioredoxin Reductase as a Potential Molecular Target for Anticancer Agents That Induce Oxidative Stress. *Cancer Research*, **64**, 6716-6724. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-3990>
- [33] Lincoln, D.T., Emadi, E.M.A., Tonissen, K.F. and Clarke, F.M. (2003) The Thioredoxin-Thioredoxin Reductase Sys-

tem: Over-Expression in Human Cancer. *Anticancer Research*, **23**, 2425-2433.

- [34] 李方超, 曾慧慧, 李贵新, 黄琰, 傅玲. 血浆硫氧还蛋白还原酶在肺癌中表达的初步研究[J]. 实用肿瘤杂志, 2014, 29(3): 231-233.
- [35] Zhou, M. and Ma, W. The Plasma Thioredoxin Reductase (TR) Activity, a Potential Diagnostic Biomarker, Is Up-Regulate in Early-Staged Non-Small Cell Lung Cancers.
- [36] Cadenas, C., Franckenstein, D., Schmidt, M., Gehrmann, M., Hermes, M., Geppert, B., *et al.* (2010) Role of Thioredoxin Reductase 1 and Thioredoxin Interacting Protein in Prognosis of Breast Cancer. *Breast Cancer Research*, **12**, R44. <http://dx.doi.org/10.1186/bcr2599>
- [37] Fu, Y.R., Yang, N., Li, Y.Q., Zhao, Y.Y., Ye, S.F., Liu, L.H. and Zeng, H.H. (2014) Evaluation of Thioredoxin Reductase as a Novel Biomarker in the Diagnosis and Treatment of Breast Cancer. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, **23**, 711-715.
- [38] Dusse, L.M.S.A., Oliveira, N.C., Rios, D.R.A. and Marcolino, M.S. (2012) Point-of-Care Test (POCT) INR: Hope or Illusion? *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*, **27**, 296-301. <http://dx.doi.org/10.5935/1678-9741.20120047>
- [39] 周玉宝, 刘芳, 武易, 房欢. POCT 检测现状与质量管理[J]. 国际检验医院杂志, 2014, 35(21): 3003.