

doi:10.3969/j.issn.1672-5565.2016.01.05

肿瘤蛋白标志物分析技术研究进展

邹攀^{1,2}, 杨鑫^{1,2}, 王静^{1,2*}, 张艳欣^{1,2}, 张敏^{1,2}, 杜鹏飞²

(1. 哈尔滨工业大学化工学院, 哈尔滨 150090 ;

2. 农业部农产品质量安全重点实验室(中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所), 北京 100081)

摘要: 目前, 我国的肿瘤发病率为 285.91/10 万, 平均每分钟有 6 人被诊断为恶性肿瘤, 因此肿瘤的早期诊断的重要性显而易见。随着分子生物学、免疫学诊断技术的飞速发展, 寻找肿瘤诊断和预后的特异性标志物已成为近期研究的热点。蛋白质是生命活动中多项功能的执行者, 可以直接反映基因给予的信息。相比于基因, 蛋白质的表达谱更可以直接地反映功能机制。针对蛋白质的生物特性, 本文总结了目前临床中筛查肿瘤蛋白标志物分析技术, 如双向凝胶电泳、基质辅助激光解吸/电离-飞行时间质谱、表面增强激光解吸/电离-飞行时间质谱、蛋白质芯片技术, 并对未来肿瘤蛋白标志物筛查提出新的展望。

关键词: 肿瘤; 蛋白标志物; 分析技术; 研究进展

中图分类号: TQ937 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-5565(2016)01-026-05

Advance in analysis techniques of screening tumor protein marker

ZOU Pan^{1,2}, YANG Xin^{1,2}, WANG Jing^{1,2*}, ZHANG Yanxin^{1,2}, ZHANG Min^{1,2}, DU Pengfei²

(1. School of Chemical Engineering & Technology, Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China;

2. Key Laboratory of Agro-product Quality and Safety, Institute of Quality Standard & Testing Technology for Agro-Product (Ministry of Agriculture, Chinese Academy of Agricultural Sciences), Beijing 100081, China)

Abstract: Nowadays, tumor incidence is high up to 285.91 in one hundred thousand, and six patients are diagnosed with malignant tumor every minute. Therefore, the early tumor diagnosis becomes more and more important. With the development of molecular biology and immune diagnosis technology, researchers pay more attention to specific marker screening for tumor diagnosis and prognosis. As the executant of many biological functions in vital movements, protein can reflect hereditary information directly, and protein expression profile is much clearer than gene expression profiling in reporting biological function mechanisms. According to the biological traits of protein, we summarized several techniques of tumor protein marker in clinical screening, including 2-D gel electrophoresis, matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight-mass-spectrometry, surface enhanced laser desorption/ionization-time-of-flight-mass-spectrometry and protein chip. At last, we put forward expectations of tumor protein marker screening.

Keywords: Tumor; Protein marker; Analysis technology; Progress

1 引言

诊断恶性肿瘤的三大重要方法是肿瘤标志物检测、影像学检查及组织病理。肿瘤标志物可应用在对恶性肿瘤的诊断和随访, 而且在鉴别诊断、疗效评

价、预后及检测复发等领域也具有极其重要的作用^[1]。肿瘤标志物(Tumor Marker, TM)是特征性存在于恶性肿瘤细胞或恶性肿瘤细胞异常产生的物质, 正常细胞没有或含量很低的特异性物质, 或者宿主受肿瘤组织的刺激而产生的物质, 与正常时或良性疾病相比, 在质和量上存在显著的差异^[2]。

收稿日期: 2015-10-15; 修回日期: 2015-12-07.

基金项目: 科技部农业科技成果转化基金项目支持(资助号: No.2008GB23260349); 国家自然科学基金项目支持(资助号: No.31000831)。

作者简介: 邹攀, 女, 博士研究生; 研究方向: 天然活性产物; E-mail: zoupan0601@163.com.

* 通信作者: 王静, 女, 教授, 博士生导师; 研究方向: 天然活性产物; E-mail: w_jing2001@126.com.

肿瘤标志物在联合临床和/或其他实验室检查中发挥着不可替代的预后价值,且其含量的波动有助于治疗前病理学分型^[3]。手术后,肿瘤及正常组织受到破坏,肿瘤标志物的含量会短期上升,其半衰期及残留肿瘤细胞对其下降速度有重要影响。当对化疗或放疗效果进行评价时,肿瘤标志物含量发生大幅下降与有效的治疗有关,而轻微下降或含量上升则通常提示疾病发展。由此可见,准确分析、确定肿瘤标记物,对肿瘤的筛查、诊断、预后及检测疗效等方面具有非同寻常的作用^[4]。

当一个正常细胞转变为肿瘤细胞时,蛋白质的表达会发生一些明显变化,蛋白质组分析技术能够从细胞水平上显示出肿瘤变化过程中蛋白质的改变。本文总结了近年来用于肿瘤蛋白标志物研究的分析技术,以期对肿瘤蛋白标志物的分析研究提供一定的基础。

2 双向凝胶电泳技术

双向凝胶电泳(2-DE)是目前蛋白组学的三大支撑技术之一,另外两个技术分别为蛋白质鉴定技术和生物信息学技术^[5]。首先根据等电点不同,蛋白质在第一向等电聚焦电泳中得到分离,随后转移到第二向SDS-聚丙烯酰胺凝胶上,再根据分子量大小进行分离。固相pH梯度等电聚焦技术的不断发展和完善,双向电泳的分辨率和重复率得到了大幅度提高。

双向凝胶电泳技术上存在固有不足,如不能分辨低丰度的蛋白,不能分辨极酸和极碱性的蛋白,不能分辨分子量过高和过低的蛋白等^[6]。但是双向凝胶电泳具有良好的直观性、实验重复性高和方法成熟稳定等优点,目前仍然是蛋白组学研究的重要手段^[7]。

郑小华等人通过优化双向电泳条件,确定了适合肝癌细胞HepG2的最佳双向电泳条件,获得了高分辨率、重复性好的2-DE图谱,分离得到335个清晰的蛋白点,为进一步开展蛋白质组学研究提供有利前提^[8]。

在双向凝胶电泳的基础上,发展出一种新型的分析手段,即荧光差异显示双向凝胶电泳(F-2D-DIGE)。等电聚焦前,首先用不同的荧光标记试剂标记等量样品,混合样品后进行双向电泳,采用不同的波长对所得到的凝胶激发,可得到不同样品结果,分析得到存在表达差异的蛋白质。本方法可以在同一块凝胶上分析多种样品,减轻工作量,降低实验误差,同时具有较宽的线性动态定量范围。此外,如在凝胶中加入内标,可使不同凝胶中蛋白质丰度的比较更加准确^[9,10]。

3 基质辅助激光解吸/电离-飞行时间质谱

基质辅助激光解吸/电离-飞行时间质谱(MALDI-TOF-MS)特别适合于蛋白等生物大分子的高通量筛选,还可以对寡核苷酸、基因的单核苷酸多态性进行分析;对天然与合成高分子的分子量和分子量分布进行分析。MALDI利用氮源脉冲激光使样品从固相表面解吸,与此同时产生一系列不同质荷比的单价气态离子,然后用TOF计量法测得离子通过相应检测器所用时间从而获得肽段的质量。

张玮等人用MALDI-TOF结合激光捕获显微切割(LCM)技术确定卵巢癌外周血中趋化因子配体18蛋白(CCL18)升高的细胞来源。正常卵巢组织上皮细胞中未检出CCL18表达,但是卵巢癌组织上皮细胞中CCL18蛋白表达量高,因此CCL18有可能成为新一代卵巢癌的肿瘤标志物^[11]。通过联合使用2-DE和MALDI-TOF-MS技术,孙明飞等^[12]、宋大萍等^[13,14]和Giribaldi^[15]等,分别建立肺腺癌、宫颈癌和肾细胞癌的差异蛋白图谱,确定了与肿瘤相关的蛋白质,为肺腺癌和宫颈癌肿瘤标志物研究奠定基础。

MALDI-TOF多肽质谱指纹识别技术(PMF)是用于蛋白定量的一种最快速、成本低廉的方法。MALDI-TOF-MS和蛋白组学仪器的迅速发展使肿瘤标志物的快速识别成为可能,并能通过体液测定对肿瘤诊断和预后提供可靠信息^[16,17]。越来越多的研究表明MALDI-TOF-MS技术不仅可用于定性分析,还有助于临床分析中蛋白标记物的定量分析^[18]。

MALDI-TOF有众多优点,如分析速度快、样品用量少、高灵敏度、操作简便、试剂价格较低及质荷比检测范围广等。但是有研究报道MALDI-TOF系统平行性和定量计算等方面的缺点。这是由于MALDI-TOF过度依赖于仪器的设置参数,如去除干扰离子的偏转质量、用于峰定量的校准类型等^[19]。MS数据含有大量噪音信号,这些噪音信号大多由仪器设置、电信号传递过程中产生的噪音等引起的。因此,在数据预处理过程中,需要减少噪音信号及系统偏差,包括校正基线、去噪音处理、信号峰校准等。此外,仍需更稳固的计算方法以降低未知的内在生物差异引起的变异影响^[20,21]。

4 表面增强激光解吸/电离-飞行时间质谱

目前,表面增强激光解吸/电离-飞行时间质谱

技术(SELDI-TOF-MS)广泛用于分析体液的蛋白多肽谱,筛选潜在疾病相关蛋白质分子^[22]。

蛋白质芯片阵列和质谱仪组成了 SELDI-TOF-MS 系统,根据蛋白质芯片的物质特性,可分为化学芯片和生物芯片两类。通过疏水力、静电力、共价键等结合样本中的蛋白质的芯片为化学芯片;生物芯片则利用受体与配体、抗原与抗体、酶与底物等的相互作用捕获样本中的蛋白质^[23]。由于 SELDI-TOF-MS 技术不依赖于蛋白质的构象,从而优于普通蛋白质芯片,因为它们需要设计与重组蛋白质结合的技术^[24,25]。

该法利用激光脉冲辐射使分析物解吸形成荷电离子,然后根据不同质荷比的离子的飞行时间不同,从而得到质谱图。通过软件分析处理后,直接显示样品中蛋白质的种类及其分子量和含量等信息。若将软件分析模拟谱图与健康人群、某种疾病病人的谱图比对分析,就能发掘该疾病相关的蛋白^[26]。几分钟内就可完成整个测定分析过程,迅速且方法敏感,结果特异性高,并且不会破坏所测定的蛋白质。

SELDI-TOF-MS 可不需处理血清、尿液、组织抽取物等直接进行点样检测^[27],使样本与可溶的基质共结晶来产生质谱信号。在 200 Da~500 kDa 区间的样品经 SELDI-TOF-MS 分析可得到清晰的质谱,每个样本的分析时间仅为几十分钟,但是得到的信息量远大于双向凝胶电泳;只要与表面探针结合,就可以检测到低丰度蛋白质,这也是双向电泳不具备的特性^[28]。SELDI-TOF-MS 具有下列优势:(1)对粗样本直接分析处理,如血清、尿液等;(2)不仅可以发现一种蛋白质或生物标记分子,而且还可以发现多种组合方式的蛋白质图谱;(3)推动基因组学发展,基于蛋白质特点发现新的基因;(4)使大规模、超微量、高通量、全自动筛选蛋白质成为可能^[29]。

徐文鸿等人采用 SELDI-TOF-MS 技术和 CM10 蛋白芯片,检测 76 例大肠癌患者术前血清蛋白质指纹图谱,筛选出的肿瘤标志物可以指导大肠癌的综合治疗,所建立的诊断模型可以辅助临床明确大肠的术前分期^[30]。相对于 SELDI-TOF-MS 在其他肿瘤中的成功应用,其在肺癌研究中没有发挥该技术的优势。目前研究很少考虑组织学类型对血清蛋白的影响,未能按国际肺癌分期标准进行实验设计等原因,因此,SELDI-TOF-MS 在肺癌研究中仍有待改进,以推动肺癌肿瘤标志物的研究^[31]。

SELDI-TOF-MS 的差异峰鉴定比较困难,主要是因为很难洗脱下结合在芯片上的蛋白质,并且结合的蛋白质含量很少,用现有的方法难以进行分析鉴定,只能得到差异多肽的分子量等信息^[32]。此

外,该技术不能进行后续鉴定,不能得出 N-端、C-端序列和蛋白质的构型,仍需要与双向电泳、生物信息学等技术联合使用^[33]。

5 蛋白质芯片技术

蛋白质芯片(Protein Chip)技术是一种高通量、高灵敏度、高特异性的分析技术。它不仅是蛋白质组学研究中强有力的工具,也是临床中疾病早期诊断、预后和治疗效果评测新手段。

蛋白质芯片用未经标记或标记的生物分子与芯片上的探针进行反应,再通过特定的扫描装置进行检测、分析处理,是一种将多种蛋白质有序地固定于介质载体上的蛋白微阵列。蛋白质芯片技术的优势有:(1)特异性强。相对于传统的 ELISA 分析,蛋白质芯片采用光敏染料标记,灵敏度高;(2)样品的前处理简单,只需对少量标本进行沉降分离和标记后,即可进行分析和检测;(3)效率极高。一次实验可实现对多种目标蛋白进行同时检测;(4)使用简单,全自动化操作,结果正确率高;(5)重复性好,不同次实验间相同两点之间差异小;(6)适用于细胞系、组织和体液等多种生物样品^[34]。

于新宇采用 12 种肿瘤标志物蛋白芯片对 12 574 名健康体检者及 6 404 名初次住院患者的血清进行检测,发现 C12 多肿瘤标志物蛋白芯片检测系统结果阳性者与临床诊断符合率高达 72.76%,为健康体检、临床肿瘤辅助诊断和高危人群早期肿瘤筛查提供新的方法^[35]。王文涛采用纳米金探针和蛋白芯片技术,建立了高灵敏度多肿瘤标志物检测体系,确定的四种肿瘤标志物在蛋白芯片上无交叉反应和相互干扰,特异性良好,进而实现多种肿瘤标志物同时快速检测,达到对肺癌早期诊断的目的^[36]。伊力亚尔·努尔如拉等人选取 40 例肾透明细胞癌患者和 53 例同期健康志愿者及非肾癌患者,运用 CM10 弱阳离子交换蛋白芯片技术与 SELDI-TOF-MS 联合检测肾癌组及对照组血清差异蛋白,得到 5 种蛋白质,预测肾透明细胞癌的灵敏度为 87.5%,为肾透明细胞癌的疗效评价、预后评估及靶向治疗有一定的参考价值^[37]。

蛋白质芯片的制备及反应过程比基因芯片更复杂。无论是将蛋白质固定于载体上又要保持其生物活性,或是蛋白质的合成来说,都存在着技术难题。该方法主要依赖于抗体及其他大分子,但是规模生产存在很多问题,需要建立高通量蛋白表达和纯化的方法。此外,需研制新载体及改进基质材料表面处理办法,以促使蛋白质特异性吸附到载体上^[38]。

随着蛋白质芯片技术的日益完善,它必将会以其各大优点在蛋白质组学和其他领域发挥越来越大的作用,为肿瘤疾病的诊断提供更有利的技术支持。

6 展望

上述方法都以其优势在分析肿瘤蛋白标志物中发挥着重要作用,但其缺点影响了该技术的广泛应用。蛋白质组学分析技术尚未发展出与基因分析中PCR扩增技术类似的技术使得低丰度蛋白质扩增,而由于高丰度蛋白质分子的掩盖,低丰度蛋白质通常很难分离。另外,对极酸性、极碱性和难溶性蛋白质进行分离和鉴定很难,因此会丢失许多重要蛋白质的信息^[39]。因此,在未来肿瘤标志物分析中,需要将各种分析手段联合起来,取长补短,多种蛋白质组学技术联合筛查肿瘤相关蛋白,这对探明肿瘤发生、发展的分子机理,提高临床早期发现肿瘤具有重要意义。此外,还需进一步丰富和发展蛋白质组学研究技术,提高敏感性、稳定性、可重复性和特异性,以期获取更准确的数据,发挥肿瘤标志物在肿瘤早期筛查、诊断、预后及治疗效果的评价中的重要价值。

参考文献

- [1] 吴健民. 影响肿瘤标志物检测的因素[J]. 中华检验医学杂志, 2005, 28(4):352-354.
WU Jianmin. Affecting factors of tumor makers[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2005, 28(4):352-354.
- [2] 王玉芳, 李首庆, 杨广民, 等. 多肿瘤标志物联合检测在恶性肿瘤诊断中的价值分析[J]. 中国现代医药杂志, 2009, 11(3):5-7.
WANG Yufang, LI Shouqing, YANG Guangmin, et al. Value analysis of combined measurement of multi-tumor markers in malignant tumor diagnosis[J]. Modern Medicine Journal of China, 2009, 11(3):5-7.
- [3] 聂代静. 肿瘤标志物在常见肿瘤中的应用及研究进展[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2013.
NIE Daijing. Application and research progress of tumor makers in common cancers [D]. Chong Qing: Medical University of Chongqing, 2013.
- [4] 余英豪. 肿瘤分子病理学临床应用基本问题[J]. 实用肿瘤杂志, 2006, 21(3):203-205.
YU Yinghao. Basic problems in clinical application of tumor molecular pathology [J]. Journal of Practical Oncology, 2006, 21(3):203-205.
- [5] ADAM B L, VLAHOU A, SEMMES O J, et al. Proteomic approaches to biomarker discovery in prostate and bladder cancers [J]. Proteomics, 2001, 1(10):1264-1270.
- [6] GUNAWARDANA C G, DIAMANDISE P. High throughput proteomic strategies for identifying tumour-associated antigens[J]. Cancer Letters, 2007, 249(1):110-119.
- [7] SRINIVAS P R, SRIVASTAVA S, HANASH S, et al. Proteomics in early detection of cancer[J]. Clinical Chemistry, 2001, 47(10):1901-1911.
- [8] 郑小华, 白瑞霞, 谭艳. 肝癌细胞株 HepG2 蛋白双向电泳条件的优化[J]. 南昌大学学报(医学版), 2013, 53(7):5-8.
ZHENG Xiaohua, BAI Ruixia, TAN Yan. Optimization of two-dimensional gel electrophoresis of proteins from Hepatocellular Carcinoma cell line HepG2 [J]. Journal of Nanchang University (Medical Sciences), 2013, 53(7):5-8.
- [9] TONGE, SHAW J, MIDDLETON B, et al. Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology [J]. Proteomics, 2001, 1(3):377-396.
- [10] YAN J X, DEVENISH A T, WAIT R, et al. Fluorescence two dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry based proteomic analysis of Escherichia coli[J]. Proteomics, 2002, 2(12):1682-1698.
- [11] 张玮, 杨莹珠, 李力, 等. CCL18 蛋白在卵巢癌组织上皮细胞中定位及定量的初步研究[J]. 广西医科大学学报, 2014, 31(1):9-13.
ZHANG Wei, YANG Yingzhu, LI li, et al. Study on the localization and quantification of CCL18 protein in epithelial cells of ovarian cancer[J]. Journal of Guangxi Medical University, 2014, 31(1):9-13.
- [12] 孙明飞, 宋言峥, 张双林, 等. 肺腺癌相关蛋白的筛选及鉴定[J]. 河南大学学报(医学版), 2012, 31(4):268-271.
SUN Mingfei, SONG Yanzheng, ZHANG Shuanglin, et al. Screening and identification of Lung Adenocarcinoma associated proteins[J]. Journal of Henan University, 2012, 31(4):268-271.
- [13] 宋大萍, 赵涌. 宫颈永生化和癌细胞的胞浆差异蛋白组学研究[J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(12):1859-1862.
SONG Daping, ZHAO Yong. Comparative proteomics analysis of cytoplasmic proteins of immortalized cervical cell and cervical cancer cell[J]. Journal of Chongqing Medical University, 2010, 35(12):1859-1862.
- [14] 宋大萍, 吕玉宇, 赵涌. 宫颈永生化和癌细胞的亚细胞蛋白质组学初步研究[J]. 华西医学, 2014, 29(1):51-53.
SONG Daping, LV Yuyu, ZHAO Yong. Subcellular proteomics analysis of immortalized cervical cell and cervical cancer cell [J]. West China Medical Journal, 2014, 29(1):51-53.
- [15] GIRIBALDI G, BARBERO G, MANDILI G, et al. Proteomic identification of Reticulocalbin 1 as potential tumor marker in renal cell carcinoma [J]. Journal of Proteomics, 2013, 91:385-392.
- [16] MAURER K, ESCHRICH K, SCHELLENBERGER W, et al. Oral brush biopsy analysis by MALDI-ToF Mass Spec-

- trometry for early cancer diagnosis [J]. *Oral Oncology*, 2013, 49(2):152-156.
- [17] RODRIGO M A M, ZITKA O, KRIZKOVA S, et al. MALDI-TOF MS as evolving cancer diagnostic tool: A review[J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014, 46(3): 245-255.
- [18] NG E W Y, WONG M Y M, POON T C W. Advances in MALDI mass spectrometry in clinical diagnostic applications[J]. *Topics in Current Chemistry*, 2014, 336:139 - 175.
- [19] KIRCHNER M, XU B, STEEN H, et al. libfbi: a C++ implementation for fast box intersection and application to sparse mass spectrometry data[J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(8):1166-1167.
- [20] MANTINI D, PETRUCCI F, PIERAGOSTINO D, et al. A computational platform for MALDI-TOF mass spectrometry data: application to serum and plasma samples [J]. *Journal of Proteomics*, 2010, 73(3):562-570.
- [21] WU L C, CHEN H H, HORNG J, et al. A novel preprocessing method using Hilbert Huang transform for MALDI-TOF and SELDI-TOF mass spectrometry data[J]. *PLoS ONE*, 2010, 5(8):1-15.
- [22] PITTERI S J, HANASH M. Proteomic approaches for cancer biomarker discovery in plasma[J]. *Expert Review of Proteomics*, 2007, 4(5):589-590.
- [23] WEINBERGER S R, DALMASSO E A, FUNG E T. Current achievements using protein chip array technology[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2002, 6(1):86-91.
- [24] KIRMIZ C, LI B, AN H J, et al. A serum glycomics approach to breast cancer biomarkers[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*; MCP, 2007, 6(1):43-55.
- [25] LEISEROWITZ G S, LEBRILLA C, MIYAMOTO S, et al. Glycomics analysis of serum: a potential new biomarker for ovarian cancer? [J]. *International Journal of Gynecological Cancer*, 2008, 18(3):470-475.
- [26] LÉONARD J F, COURCOL M, GAUTIER J C. Optimization of SELDI for biomarker detection in plasma[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2010, 691:351-368.
- [27] WANG Yushan, CHANG Hengjui, CHANG Yuecune, et al. Serum Amyloid A as a predictive marker for radiation pneumonitis in Lung cancer patients [J]. *International Journal of Radiation Oncology · Biology · Physics*, 2012, 85(3):791-797.
- [28] PAWELETZ C P, LIOTTA L A, PETRICOINE F. New technologies for biomarker analysis of prostate cancer progression: Laser capture microdissection and tissue proteomics[J]. *Urology*, 2001, 57(4 Suppl 1):160-163.
- [29] DENG B, DONG Z, LIU Y, et al. Effect of pretreatment protocols on human amniotic fluid protein profiling with SELDI-TOF MS using protein chips and magnetic beads [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2010, 411(15-16):1051-1057.
- [30] 徐文鸿, 陈益定, 胡跃, 等. 激光解吸电离-飞行时间质谱技术和 CM10 蛋白质芯片检测术前大肠癌分期的意义 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2006, 28(10):753-757.
- XU Wenhong, CHEN Yiding, HU Yue, et al. Preoperative molecular staging of colorectal cancers by CM10 protein-chip and SELDI-TOF-MS analysis[J]. *Chinese Journal of Oncology*, 2006, 28(10):753-757.
- [31] 周继红, 柳广南. 电离-飞行时间质谱技术在肺癌早期诊断中的应用现状及前景[J]. *医学综述*, 2010, 16(9):1342-1344.
- ZHOU Jihong, LIU Guangnan. Application status and prospects of SELDI-TOF-MS in early diagnosis of lung cancer [J]. *Medical Recapitulate*, 2010, 16(9):1342-1344.
- [32] CHO C K, SHAN S J, WINSOR E J, Diamandis E.P.. Proteomics analysis of human amniotic fluid[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2007, 6(8):1406 - 1415.
- [33] DIAMANDIS E P. Mass spectrometry as a diagnostic and a cancer biomarker discovery tool: opportunities and potential limitations[J]. *Molecular & Cell Proteomics*, 2004, 3(4):367-378.
- [34] XIAO X Y, LIU D H, TANG Y, et al. Development of proteomic patterns for detecting lung cancer[J]. *Disease Markers*, 2003, 19(1):33-39.
- [35] 于新宇. 多肿瘤标志物蛋白芯片在临床肿瘤筛查中的应用价值[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2012.
- YU Xinyu. The applied values of tumor marker protein biochip in clinical tumor scan[D]. Chong Qing: Medical University of Chongqing, 2012.
- [36] 王文涛. 基于纳米金探针和蛋白芯片高灵敏检测肺癌多肿瘤标志物的研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2013.
- WANG Wentao. The study of highly sensitive detection of multiple tumor markers for lung cancer based on gold nanoparticle probes and protein chip[D]. Zheng Zhou: Zhengzhou University, 2013.
- [37] 伊力亚尔·努尔如拉, 木拉提·热夏提, 王文光, 等. 肾透明细胞癌血清差异性蛋白质表达及临床意义研究 [J]. *中国全科医学*, 2015, 18(3):288-293.
- YILYAER Nuerrula, MULATI Rexiati, WANG Wenguang, et al. Expression and clinical significance of serum differentiated protein among patients with clear-cell renal cell carcinoma[J]. *Chinese General Practice*, 2015, 18(3):288-293.
- [38] 孙平, 张逢春, 张影. 蛋白质芯片技术的研究及应用现状[J]. *北华大学学报(自然科学版)*, 2009, 10(2):115-120.
- SUN Ping, ZHANG Fengchun, ZHANG Ying. Protein microarray technology and application status[J]. *Protein microarray technology and application status*[J]. *Journal of Beihua University (Natural Science)*, 2009, 10(2):115-120.
- [39] 肖高明. 人肺腺癌蛋白质组学研究[D]. 长沙: 中南大学, 2007.
- XIAO Gaoming. Proteomics analysis of human lung adenocarcinoma [D]. Chang Sha: Central South University, 2007.