

第 1 章 绪 论

1.1 研究背景

1.1.1 疾病标志物检测研究意义

生命健康是人类亘古不变关注的话题。近年来,一些神经系统疾病^[1]、代谢系统疾病^[2-3]及各类癌症严重威胁人类生命健康,给国民经济的发展带来沉重负担。例如,帕金森综合征是一种老年人高发的神经退行性疾病。据统计,2020 年美国帕金森综合征患者约有 93 万人^[4]。2022 年,美国社会为帕金森综合征患者的直接治疗、护理等相关项目的经济支出高达 600 亿美元^[1]。中国是全球帕金森综合征患者最多的国家,患者人数约为美国的 3 倍^[4]。随着我国老龄化程度的逐渐加剧,帕金森给社会带来的经济负担将进一步加重^[5]。随着经济的发展,人民物质生活水平不断提高,糖尿病、高尿酸血症等代谢系统疾病的患病人数也逐年升高。2021 年,中国糖尿病患者人数高达 1.409 亿,健康支出达 1653 亿美元^[2]。目前,中国高尿酸血症患者约占总人口的 12%,已超越糖尿病患者数量。2019 年,因高尿酸血症重症导致痛风患者的人数已达 1616 万人^[3],痛风致残人数也持续增加。此外,各类癌症已成为导致死亡的主要疾病。2022 年,我国癌症死亡人数约为 321 万人,约占全球癌症死亡人数的 32.2%,每年因癌症产生的医疗支出高达 2200 亿元^[6-9]。

事实上,人的身体从健康发展到疾病,往往是一个由量变到质变的过程。在这个过程中,把与疾病相关的生物标志物加以检测对疾病的早期诊断、治疗、预后及预防等具有重要指导意义,有望减少疾病对人类健康的威胁,降低死亡率,延长人类预期寿命。通过检测与疾病相关的一种或多种生物标志物的变化,可以帮助医生定位患者的患病状态。

目前,学者们已发现多种与疾病相关的生物标志物,并将其应用于疾病临床诊断或病理研究。表 1.1 总结了人体中一些重要的生物标志物及与其

相关的疾病。

表 1.1 生物标志物及其相关的疾病^[10-18]

疾病种类	生物标志物	相关疾病
神经系统疾病	多巴胺	帕金森综合征 ^[10] 、精神分裂症 ^[11]
	乙酰胆碱	阿尔兹海默症 ^[12]
	血清素	抑郁症等 ^[13]
代谢系统疾病	尿酸	高尿酸血症、痛风 ^[14]
	葡萄糖	糖尿病 ^[15]
	维生素 C	坏血病 ^[16]
癌症	前列腺特异性抗原	前列腺癌 ^[17]
	甲胎蛋白	肝癌、卵巢癌 ^[18]
	癌胚抗原	直肠癌、乳腺癌、肺癌 ^[18]
	糖类抗原 15-3	乳腺癌 ^[18]
	糖类抗原 19-9	胰腺癌 ^[18]

在神经系统疾病相关的标志物中,多巴胺(dopamine, DA)是一种脑内重要的儿茶酚胺神经递质,结构式如图 1.1(a)所示,可以调控哺乳动物的运动、学习、睡眠^[19]、记忆^[20]、情绪反应^[21-23]等。健康人脑内纹状体尾状核细胞外液(extracellular fluid, ECF)的 DA 浓度一般为 $0.01 \sim 1 \mu\text{mol/L}$ ^[24]。研究表明,DA 浓度异常与帕金森综合征^[10]、精神分裂症^[11]、急性焦虑及神经母细胞瘤^[25]等有关。2019 年,Chand 等总结的帕金森综合征发病机制,如图 1.1(b)所示^[26]。帕金森病患者因脑内 DA 分泌神经元受损,使得 DA 含量极少,其 ECF 中仅有 nmol/L 量级的 DA^[24]。这使得纹状体对运动指令执行障碍,出现静止震颤等症状^[5]。2007 年,Fonteh 等发现阿尔茨海默病患者血液中的 DA 可达 $18 \mu\text{mol/L}$ ^[27],远高于体液正常浓度。因此,DA 检测对神经系统疾病的诊疗至关重要。

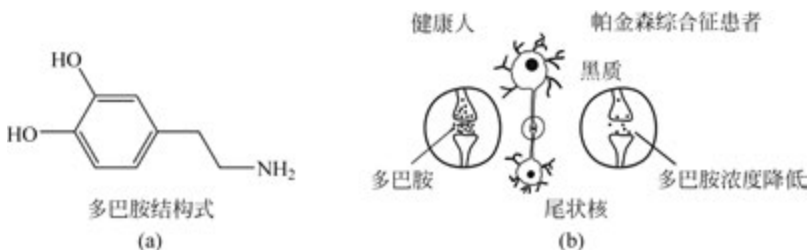


图 1.1 多巴胺结构式与帕金森综合征发病机制

(a) 多巴胺结构式; (b) 帕金森综合征发病机制^[26]

在代谢系统疾病相关的标志物中,尿酸(uric acid, UA)是人体内嘌呤代谢产物,结构式如图 1.2(a)所示。尿酸作为人体内一种重要抗氧化剂,可以抵抗衰老^[28],广泛存在于血液、尿液和肾脏中。在 1500 万—2000 万年前,人类、猿类等灵长类动物体内尿酸酶基因突变失活,致使其体内尿酸浓度远高于其他非灵长类哺乳动物(小于 120 $\mu\text{mol/L}$)^[29]。健康人体血液中的尿酸浓度通常为 208~428 $\mu\text{mol/L}$ ^[29],男性血尿酸浓度大于女性。在正常饮食下,男性血尿酸高于 420 $\mu\text{mol/L}$ 、女性血尿酸高于 360 $\mu\text{mol/L}$,即认为患有高尿酸血症。图 1.2(b)展示了高血尿酸引发痛风的发病机制^[14]。当尿酸浓度高于生理溶解度时,尿酸盐会沉积结晶,引发痛风。除高尿酸血症与痛风外,慢性肾脏疾病、高血压、心房颤动、冠状动脉疾病等疾病也与尿酸浓度升高有关^[30]。因此,体液内尿酸浓度检测对高尿酸血症、痛风、慢性肾病等代谢系统疾病的诊断具有重要意义。

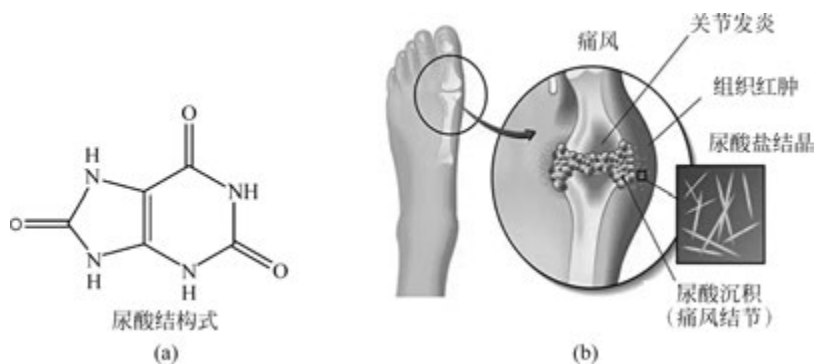


图 1.2 尿酸结构式与痛风发病机制

(a) 尿酸结构式; (b) 痛风发病机制^[14]

在各类癌症中,前列腺癌(prostate cancer, PCa)已成为全世界男性第二易患的癌症^[31]。PCa 早期诊断可构筑患者的第二道保护屏障,可以帮助指导癌症治疗,提高患者的存活率^[32]。前列腺癌特异性抗原(prostate specific antigen, PSA)是前列腺上皮细胞分泌的一种用于精液液化的丝氨酸蛋白酶(33-34 KDa)^[33],已成为前列腺癌早期临床诊断重要的特异性生物标志物。在发达国家中,随着 PSA 检测的普及,PCa 的死亡率显著下降^[7,17]。如图 1.3 所示,Ruth 等发现,在 20 世纪 90 年代,随着 PSA 筛查的引入,美国 PCa 的死亡率下降了 30%^[34]。然而,在经济不发达地区,由于 PSA 检测成本较高,未得到普及,PCa 死亡率持续升高^[17]。因此,PSA

检测对前列腺癌的早期诊断具有重要意义,亟须开发一种低成本、便于推广的 PSA 检测方式^[33]。

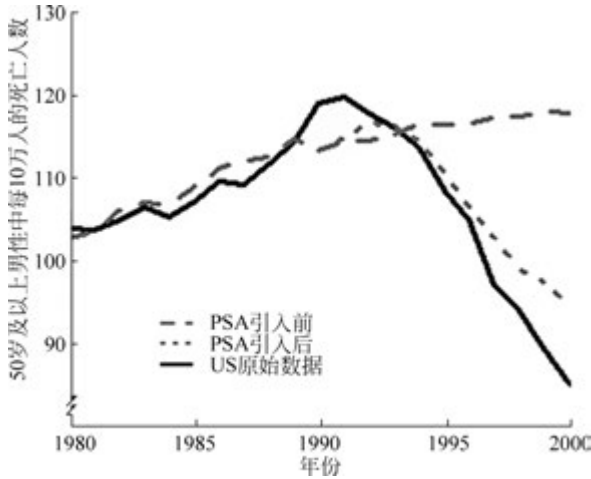


图 1.3 密歇根大学预测美国 50 岁及以上男性的 PCa 死亡率与 PSA 检测的模型^[34]

综上所述,精准检测体液内多发性疾病相关标志物,对保护人类生命健康及降低社会健康支出经济负担具有重要意义。本书选择多巴胺、尿酸、前列腺癌特异性抗原作为待测疾病标志物,致力于开发一种可满足未来发展需求的检测方式。

1.1.2 疾病标志物检测需求分析

根据多巴胺、尿酸、前列腺癌特异性抗原所关联的疾病,本节结合其具体应用场景,分析了其检测需求,结果见表 1.2。

表 1.2 待测生物标志物的检测需求分析

待测物	体液内正常浓度	应用场景	检测需求
神经递质 DA	0.01~1 $\mu\text{mol/L}$	疾病模型探究	易小型化、快速测量、低检测下限
嘌呤代谢物 UA	30~428 $\mu\text{mol/L}$	患者居家检测	易小型化、快速测量、低检测下限、宽检测范围

续表

待 测 物	体 液 内 正 常 浓 度	应 用 场 景	检 测 需 求
癌症标志物 PSA	0.5~2 ng/mL	早期筛查、术后定期复检(用于小型医疗单位或居家检测)	易小型化、快速测量、低检测下限、宽检测范围

多巴胺是神经系统疾病研究的一种重要神经递质。监测生物体内多巴胺的浓度变化,可以帮助学者研究神经系统疾病发病过程,并帮助寻找治疗药物和方法。脑内多巴胺浓度极低,最低浓度仅约 10 nmol/L^[24],故要求传感器具有低检测下限。一些神经系统疾病的发作时间较短,如癫痫发作持续时间一般小于 5 min^[35],故要求传感器检测耗时短。此外,仪器的小型化是在线实时检测的基础。因此多巴胺检测要求检测仪器具有易小型化、快速测量、低检测下限等特点。

尿酸检测主要用于健康人群及代谢系统疾病患者的日常诊断,而居家诊断是未来尿酸检测的大趋势。尿酸在健康人群体液内浓度变化较大:血液中浓度最高可达 428 $\mu\text{mol/L}$,痛风患者的尿酸浓度更高;汗液中尿酸浓度远低于血液,约为 30 $\mu\text{mol/L}$ ^[14]。因此,根据尿酸检测应用场景,检测仪器需要具有易小型化、快速测量、低检测下限、宽检测范围等特点。

前列腺癌特异性抗原检测主要用于临床前列腺癌的早期诊断和患者术后定期检测。PSA 在血液中的含量极低,主要存在于精液中。健康男性血清中的总 PSA 浓度通常低于 4 ng/mL^[36]。随着前列腺癌的发展,精血屏障破裂,患者血液中 PSA 浓度显著增加。通常认为血清中 PSA 浓度高于 10 ng/mL 与早期 PCa 有关^[37]。目前大型医院及第三方检测机构采用的 PSA 临床诊断仪器,价格昂贵、体型大,需要专业技术人员才可操作^[38]。这些问题使 PSA 检测仅能在专业的实验室或大型医院才可实现,检测周转时间最多可达几周^[39]。这不仅增加了癌症患者的治疗费用及时间,也制约了 PSA 检测在经济不发达地区的推广。未来 PSA 检测的发展大方向是实现小型医院或居家检测。根据未来的应用场景,PSA 检测仪器需要具有易小型化、快速测量、低检测下限、宽检测范围等特点。

结合以上分析可知,易小型化、可快速测量、低检测下限是多巴胺、尿酸、前列腺癌特异性抗原检测未来的一致需求。除此之外,为满足居家检测及实时检测等应用场景,检测仪器还应具备成本低、操作简单、耗时短等特点。

1.1.3 疾病标志物检测方法分析

随着科技的发展,目前已有许多成熟的分析方法用于多巴胺、尿酸、前列腺癌特异性抗原检测,包括色谱法、质谱法、光谱法和电化学检测法等。本节简要介绍前三种方法的基本原理及应用现状,结合多巴胺、尿酸、前列腺癌特异性抗原检测未来发展需求,分析最合适的检测方法。

色谱法是用流动物质对固定相进行洗脱,若固定相中的待测物质相比于其他物质流动速率显著不同,则可测得待测物质的浓度。色谱法通常操作耗时长,需几日甚至几周才能完成一次分析。高效液相色谱是在经典色谱法的基础上进行改进,通过高压驱动流动相,大大缩短了分析时间,图 1.4 展示了美国 Waters 公司 1525 型高效液相色谱系统。Parinam 等采用高效液相色谱方法来检测血浆中的多巴胺等物质^[40],检测下限达到 10 pg/mL,约 5.27 nmol/L。但这种仪器相对较大,需专业技术人员操作。总体而言,色谱法灵敏度高,可同时进行多种物质的分析,但同时也存在仪器价格昂贵、体型庞大、需专业人士操作等不足。



图 1.4 美国 Waters 公司 1525 型高效液相色谱系统

质谱法是将待测样品离子化后,在电场和磁场作用下,不同质量电荷比(质荷比)的物质会经历不同的偏转次数。根据待测物质的质荷比,可在质谱图中找到对应物质及其峰值。质谱法已用于有机、无机和生物分析。2022 年,哈尔滨工业大学 Jie Jiang 等提出了一种电化学—中性再电离—质谱联用的方法,原理如图 1.5 所示,该方法被应用于研究多巴胺的氧化过程^[41]。

此外,Xinhua Dai 等采用同位素稀释的方法,设计出一种高效液相色谱

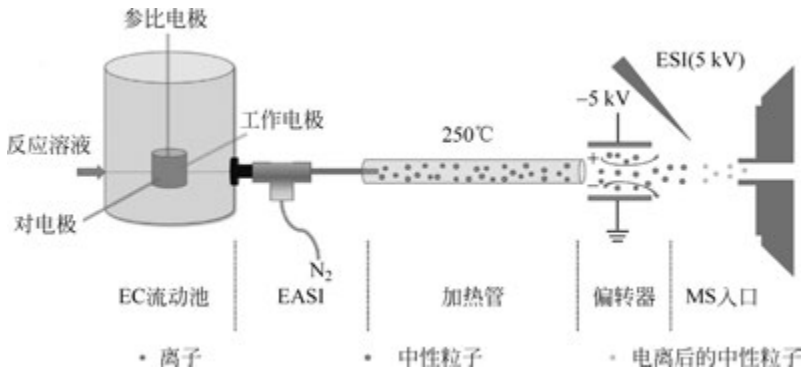


图 1.5 电化学—中性再电离—质谱联用在线研究多巴胺氧化过程^[41]

与质谱联用分析方法,并用于尿酸检测^[42]。质谱法检测速度快、灵敏度高、选择性好、可同时检测多种物质,可用于未知样品检测。但质谱分析需要对样品进行复杂的预处理操作,且所需仪器价格昂贵、体型庞大,并不适合居家或在线实时检测应用场景。

光谱法是根据物质在特定波段的吸收、发射、散射能量或波长变化来进行检测。目前,光谱分析原理常用于多巴胺、尿酸、前列腺癌特异性抗原检测,主要方案有比色法、荧光法、酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)和化学发光法等。

比色法是尿酸临床检测的主流方法^[43],主要利用尿酸酶对尿酸的催化作用。2021年, Fan Li 等采用比色法测定尿酸浓度,原理如图 1.6 所示^[44]。首先利用尿酸酶催化尿酸生成尿囊素和过氧化氢,然后利用壳聚糖稳定的纳米金颗粒催化过氧化氢生成羟基自由基,导致三甲基苯甲酰基(trimethylbenzene, TMB)发生显色反应,可在 652 nm 处产生良好的线性

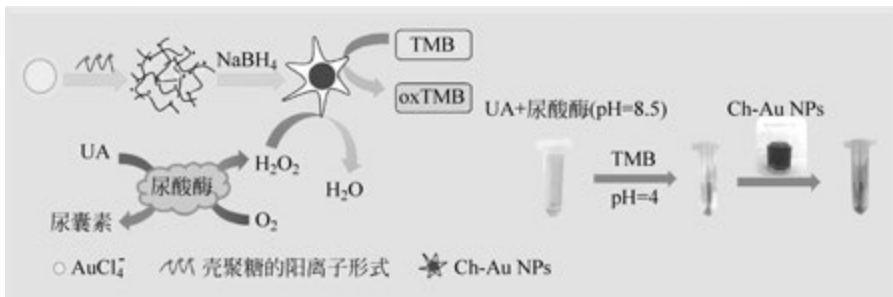


图 1.6 尿酸酶比色法检测尿酸原理图^[44]

吸光度变化,检测范围为 $0.1 \sim 30 \mu\text{mol/L}$ 。比色法操作简单、快速且成本低。但检测灵敏度低,且实验必需的尿酸酶、过氧化氢酶等生物酶易失活,检测精度不稳定。

荧光法已被用于多巴胺检测。如图 1.7 所示,Adem 等^[45]提出一种直接在碱性溶液中合成聚多巴胺荧光纳米颗粒的方法,在 510 nm 的紫外吸收光谱记录到良好的荧光响应,可在 $0.1 \sim 20 \mu\text{mol/L}$ 范围内进行多巴胺检测,具有良好的选择性及灵敏度。但这种方法响应时间仍然较长,单次数据测量总耗时约 60 min ,且需要强酸、强碱做辅助预处理。综上可知,荧光法灵敏度高,选择性好,但耗时长,辅助处理步骤复杂。此外荧光材料如量子点、纳米颗粒等制备工艺复杂,对环境有毒害^[46],限制了荧光检测法的广泛应用。

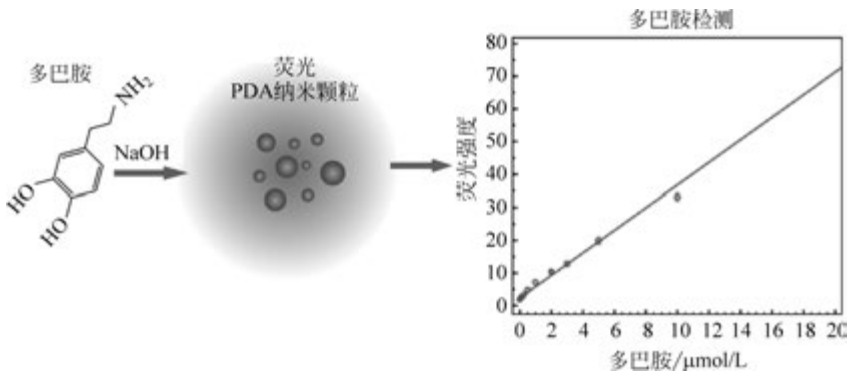


图 1.7 碱性溶液直接合成聚多巴胺荧光纳米颗粒用于荧光法测 DA^[45]

酶联免疫吸附测定法精度和稳定性高,是抗原检测的金标准,已被用于 PSA 检测。传统的三明治法 ELISA 检测方案操作步骤如图 1.8(a)所示,先经过抗原捕获、一抗免疫结合、标记生物素的二抗结合后,再经过生物素与亲和素结合,将催化酶结合在酶标板表面。然后分别在酶标板上加入显色剂和终止液。根据显色深度可以对比得到待测抗原的浓度,总耗时约 3 h 。而且显色过程往往是由无色变为蓝色,难以对低浓度待测物进行肉眼定量检测。2012 年,Roberto 等^[47]在 *Nature Nanotechnology* 上提出了一种超灵敏度的 Plasmonic ELISA 方案,用于 PSA 的肉眼检测,原理如图 1.8(b)所示。Roberto 等利用酶标记量控制金纳米颗粒的生长过程。随着待测物浓度升高,显色液可显示从蓝色到红色变化,灵敏度大大提升,但操作仍然复杂,耗时长。综合来讲,ELISA 方案精度和稳定性较高,但灵敏度较低、操作复杂、耗时长^[47]。

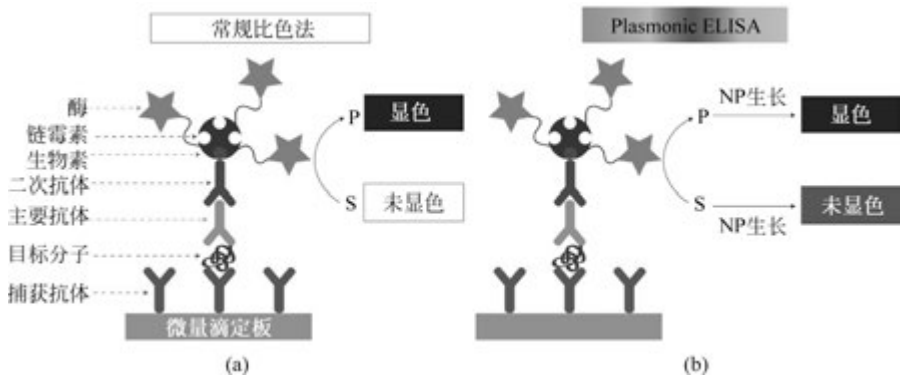


图 1.8 传统方案与 Plasmonic ELISA 方案

(a) 传统方案; (b) Roberto 等提出的超灵敏度 Plasmonic ELISA 方案^[47]

化学发光法的免疫结合检测抗原步骤与 ELISA 类似,但读数方式有所不同。ELISA 读数采用酶标仪读取显色溶液的吸光度。化学发光则是利用化学反应激发的能量,读取特定波段的发光强度。如鲁米诺经过过氧化氢氧化后,发出的蓝光可作为化学发光读数的指示剂。Honglan Qi 等^[48]提出了一种基于多肽电诱导化学发光方法,用于前列腺癌特异性抗原检测。他们将三联吡啶氯化钌(化学发光物)和特异性多肽修饰在传感器表面。前列腺癌特异性抗原加入后,培养 40 min,即可通过竞争法将多肽剪切。发光强度与前列腺癌特异性抗原浓度线性相关,检测下限可达 0.8 pg/mL。化学发光法灵敏度高、检测下限低、可实现全自动化操作,是国内外免疫诊断市场中的主流方案,图 1.9 所示为郑州安图生物全自动化学发光测定仪。但是,化学发光法同样存在仪器体型庞大、检测成本高、周转周期长、测量背景噪声大等不足。



图 1.9 郑州安图生物公司全自动化学发光测定仪

综合以上分析,本书总结了色谱法、质谱法、光谱法中用于多巴胺、尿酸、前列腺癌特异性抗原分析的主要技术特点,见表 1.3。在多巴胺、尿酸这类小分子检测中,高效液相色谱法和质谱法虽然在实验室中检测灵敏度较高,但仪器庞大、操作复杂、难以满足小型化需求。比色法虽然检测成本低,但需要特殊的显色试剂及生物酶。荧光法虽然灵敏度高,但检测耗时过长。在前列腺癌特异性抗原这类蛋白检测中,酶联免疫吸附测定法和化学发光法是目前临床检测常用方法,具有较高的检测精度,但也存在检测耗时长、仪器设备小型化困难等问题。这些问题制约了多巴胺、尿酸、前列腺癌特异性抗原检测在居家检测及实时检测方向的应用。

表 1.3 典型的色谱法、质谱法、光谱法检测方法总结

检测方法		检测物种类	优点	不足
色谱法	高效液相色谱法	多巴胺 ^[40]	灵敏度高、选择性好	仪器昂贵、体型庞大、操作复杂
质谱法	质谱法	多巴胺 ^[41] 、尿酸 ^[42]	灵敏度高、选择性好	仪器昂贵、体型庞大、操作复杂
光谱法	比色法	尿酸 ^[43-44]	耗时短、成本低	需特定显色试剂及生物酶
	荧光法	多巴胺 ^[45]	灵敏度高、选择性好	检测耗时长、荧光材料制备复杂
	酶联免疫吸附测定法	前列腺癌特异性抗原 ^[47]	检测精度、稳定性高	灵敏度低、操作复杂、耗时长
	化学发光法	前列腺癌特异性抗原	灵敏度高、可自动化操作	背景噪声大

近年来,基于场效应晶体管(field effect transistor, FET)原理的检测方法得到了学者们的广泛关注。FET 传感器的检测原理是基于半导体场效应晶体管的基本结构,在栅极修饰敏感材料,如酶、抗体、DNA 等^[49-51],当待测物与敏感材料结合后,由于表面电荷的变化,栅极电位发生改变,进而显著影响源极和漏极之间的电流或电导^[50]。当 FET 传感器工作在阈值电压以下时,表面电荷的微小变化即可带来指数级的信号变化^[50]。这种方法灵敏度高,但动态范围较窄,对测试环境的离子强度和 pH 值非常敏感,存在半导体器件输出的非线性问题^[50],而且检测过程依赖于敏感材料与待测物质的特异性结合作用,无法实现多巴胺、尿酸等小分子的无酶检测。

相比之下,电化学检测方法无需外加生物酶,可以直接在电极表面采集