

学校编码: 10384

分类号 _____ 密级 _____

学号: 200425016

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

血液卟啉荧光快速筛查早期恶性肿瘤初探

Preliminary Study of Early Cancer Screening by Porphyrin

Fluorescence in Blood

张 荣 斌

指导教师姓名: 李 耀 群 教 授

专 业 名 称: 分 析 化 学

论文提交日期: 2 0 0 7 年 12 月

论文答辩时间: 2 0 0 7 年 月

学位授予日期: 2 0 0 7 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2007 年 12 月

厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。
本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

目 录	
摘 要	I
Abstract	II
第一章 文献综述	1
1.1 肿瘤及其临床诊断	1
1.1.1 肿瘤简介	1
1.1.2 肿瘤的临床诊断	3
1.2 荧光法在肿瘤诊断中的应用概况	6
1.2.1 荧光诊断技术	7
1.2.2 荧光图像技术	10
1.3 卟啉及生物标志物	11
1.3.1 卟啉及其代谢	11
1.3.2 卟啉的检测方法	14
1.4 导数技术与前表面荧光技术	15
1.4.1 导数技术	16
1.4.2 前表面荧光技术	16
1.5 论文构思	17
参考文献	19
第二章 血清一阶导数荧光光谱诊断早期恶性肿瘤	32
2.1 引言	32
2.2 实验部分	32
2.2.1 仪器与试剂	33
2.2.2 实验方法	33
2.3 结果与讨论	33
2.3.1 溶剂的考察	33
2.3.1 原卟啉标准样的一阶导数荧光光谱	35

2.3.2 未经处理的及乙醇处理后的血清的荧光光谱.....	35
2.3.3 乙醇处理后的血清的零阶及一阶导数荧光光谱.....	39
2.3.4 数据分析结果.....	39
2.4 小结	42
参考文献	44
第三章 全血前表面荧光诊断恶性肿瘤	46
3.1 引言	46
3.2 实验部分	46
3.2.1 仪器与试剂.....	46
3.2.2 实验方法.....	48
3.3 结果与讨论	52
3.3.1 原卟啉与锌原卟啉标准样的光谱性质.....	52
3.3.2 前表面直接扫描全血的荧光光谱图.....	54
3.3.3 数据结果与分析.....	56
3.4 小结	59
参考文献	60
附录	64
致谢	65

CATALOG

Abstract (Chinese)	I
Abstract (English)	II
Chapter 1 Preface	1
1.1 Tumor and Clinical Diagnosis	1
1.1.1 Introduction of Tumor	1
1.1.2 Clinical Diagnosis of Tumor	3
1.2 Applications of Fluorescence in Tumor Diagnosis	6
1.2.1 Fluorescence Diagnostic Techniques	7
1.2.2 Fluorescence Image Technology	10
1.3 Porphyrins and Biomarker	11
1.3.1 Porphyrins and Its Metabolism	11
1.3.2 Detection Method of Porphyrin	14
1.4 Derivative Technique and Front-surface Fluorescence Technology	15
1.4.1 Derivative Technique	16
1.4.2 Front-surface Fluorescence Technology	16
1.5 Conception of Dissertation	17
References	19
Chapter 2 Cancer Diagnosis at Early Stage by Serum Using Derivative Fluorescence Emission Spectra	32
2.1 Introduction	32
2.2 Experimental	32
2.2.1 Instrumentation and Reagents	33
2.2.2 Method	33
2.3 Results and Discussions	33
2.3.1 Inspection of Solvent	33

2.3.1 First-derivative Fluorescence Spectrum of Protoporphyrin Standard...	35
2.3.2 Fluorescence Emission Spectra of Untreated Serum and Serum Supernatant Extracted with Ethanol.....	35
2.3.3 Fluorescence Emission Spectrum and First-derivative Fluorescence Emission Spectrum of Serum Supernatant Extracted with Ethanol.....	39
2.3.4 Results of Statistical Analysis	39
2. 4 Conclusions	42
References	44
Chapter 3 Cancer Diagnosis at Early Stage by Whole Blood Using Front-surface Fluorescence Spectra	46
3.1 Introduction	46
3.2 Experimental	46
3.2.1 Instrumentation and Reagents	46
3.2.2 Method	48
3.3 Results and Discussions	52
3.3.1 Spectral Character of Protoporphyrin and Zinc Protoporphyrin Standard	52
3.3.2 Fluorescence Spectra of Whole Blood by Front-surface Technique.....	54
3.3.3 Results and Statistical Analysis.....	56
3. 4 Conclusions	59
References	60
Appendix	64
Acknowledgements	65

摘 要

荧光分析法相对于其他光谱法有三个主要优势——高灵敏度、快速、高选择性，近年来已广泛用于癌症诊治领域。本论文致力于荧光光谱法用于快速诊断早期癌变的研究。使用无水乙醇对血清样进行简单处理，结合导数技术，建立了血清原卟啉值的荧光快速筛查方法，并应用于早期癌变诊断；另外，不对全血样品进行任何处理，使用薄型液池和前表面技术，提出了直接快速筛查全血中原卟啉和锌原卟啉比值的前表面荧光法，并将其用于早期癌变诊断。论文分为三章：

第一章是文献综述，总结了肿瘤的临床诊断及荧光技术在肿瘤诊断中的应用和发展；总结了原卟啉作为生物标志物的概况及卟啉物质的测定方法；阐述了导数技术与前表面技术在荧光光谱法中的应用与发展。最后提出了本论文的研究设想。

第二章通过 Vistar 大鼠接种恶性肉瘤来模拟人患上癌症，利用血清中能被乙醇萃取的原卟啉的自身荧光光谱来辨别早期癌变，并结合导数技术，实现了血清一阶导数荧光光谱快速诊断早期恶性肿瘤的目的。该方法只需使用无水乙醇对血清样品进行简单的前处理，操作简单、快速、费用低廉。将该方法用于 20 例正常样与 10 例早期癌变样的辨别得知，10 例早期癌变样的假阴性率为 0%，而 20 例正常样中仅有一例假阳性，通过 t 检验数据分析，确定了正常样与癌变样的显著差异 ($P < 0.001$)。

第三章首次提出直接扫描全血样用于诊断恶性肿瘤的前表面荧光分析方法。通过 SD 小鼠接种恶性肉瘤来模拟人患上癌症，不需对全血样进行任何处理，使用前表面荧光技术直接快速测定全血样品中的原卟啉和锌原卟啉值，并用他们的荧光强度比值作为判别依据，用于筛查早期癌变。对于正常样与早期癌变样虽然目前无法完全将每个样品区分开，但是通过实验结果可知原卟啉与锌原卟啉的荧光强度比值在正常血样与早期癌变样中存在显著性差异，可作为区分正常样与早期癌变样的参考依据。该方法通过不断地深入研究改进有望用于筛查早期肿瘤。

关键词：卟啉；荧光；恶性肿瘤诊断

Abstract

There are three major advantages of fluorescence spectroscopy over other spectral methods: high sensitivity, high speed, and high selectivity. Recently it has been used broadly in the field of cancer diagnosis. The dissertation focuses on the studies of rapid diagnosis of early cancer by fluorescence. Serum samples were extracted with ethanol on simple processing, combined with derivative technique, a rapid fluorescence method was established to determine the value of protoporphyrin IX in serum and applied to diagnose cancer at early stage; With whole blood samples prepared without any processing, the thin liquid cuvette and the front-surface technique, a direct fluorescence method was brought forward to detect protoporphyrin IX and zinc protoporphyrin in the whole blood and was used in the diagnosis of cancer at early stage. The dissertation is composed of following parts:

In the first chapter, the literature was summarized. The clinical methods of tumor diagnosis and the application and development of fluorescence technique in the diagnosis of tumor were introduced. The application and development of fluorescence spectrometry combined with derivative technique and front-surface technology were reviewed. The profile of protoporphyrin IX as biomarker and the determination of porphyrins were also summarized. The plan of dissertation was put forward at the last part of this chapter.

In the second chapter, Vistar big mice were inoculated with sarcoma to simulate cancer in human. The autofluorescence of protoporphyrin IX extracted from serum with ethanol was used to identify normal and early cancer samples. In combination with derivative technique, a rapid derivative fluorescence method could be achieved to diagnose cancer at the early stage. Simple pre-treatment was used in this method, and the operation was simple, rapid and inexpensive. The method had been applied to identify twenty normal and ten early cancer samples. No false negative sample was

found in all ten cancer samples, and only one sample was false positive in normal samples. According to the statistical analysis done with t-test, the significant difference between healthy and early cancer samples is well established.

In the third chapter, a direct front-surface fluorescence method was proposed for the first time to diagnose cancer at early stage by whole blood. SD mice were inoculated with sarcoma to simulate cancer in human. The whole blood was prepared without any treatment and was directly scanned by the front-surface fluorescence to determine protoporphyrin IX and zinc protoporphyrin values. And then their fluorescence intensity ratios were used as a basis for screening early cancer. Though the normal and early cancer samples could not be absolutely distinguished, according to the experiments and data, the significant difference between healthy and early cancer samples were obtained. The method improved by further study is expected for the screening of malignant tumors at early stage.

Keywords: Porphyrin; Fluorescence; Cancer Diagnosis

第一章 文献综述

1.1 肿瘤及其临床诊断

1.1.1 肿瘤简介

肿瘤是机体中成熟的或正在发育的正常细胞在各种致癌因素作用下,呈现而形成的新生物,而这种新生物的细胞增殖不同于正常细胞的增殖[1]。肿瘤细胞具有异常的形态、代谢和功能,它生长旺盛,常呈持续性生长。肿瘤按照性质可分为良性和恶性(表1.1)。一般良性肿瘤命名是组织来源+瘤,如纤维瘤、肾上腺皮质腺瘤等。恶性肿瘤的命名是:来自上皮组织成为癌,即组织来源+癌,如柱状细胞癌等;来自间叶组织的称肉瘤,如纤维肉瘤等[2]。有少数恶性肿瘤不按上述原则命名,如有些来源于幼稚组织及神经组织的恶性肿瘤称为母细胞瘤,如神经母细胞瘤、髓母细胞瘤、肾母细胞瘤等;有些恶性肿瘤成分复杂或由于习惯沿袭,则在肿瘤的名称前加“恶性”二字,如恶性畸胎瘤、恶性淋巴瘤、恶性黑色素瘤等。有些恶性肿瘤冠以人名,如尤文、霍奇金病;或按肿瘤细胞的形态命名,如骨的巨细胞瘤、肺的燕麦细胞癌。至于白血病、精原细胞瘤等则是少数采用习惯称呼的恶性肿瘤,虽称为“瘤”或“病”,实际上是恶性肿瘤。

癌症是全世界一个主要死亡原因。在2005年全世界5800万死亡总数中,癌症占有所有死亡的760万(或13%)。目前有2460万癌症患者;到2020年,估计将达到3000万。到2020年,癌症每年可造成1000多万人死亡。如果这一趋势继续,每年新病例的估计数预期至2020年将增加致1600万。这些病例的约60%将发生在世界较不发达地区。

一些致病因素与癌症的形成有关:不健康的生活方式(使用烟草和酒精,不适当的饮食,缺乏身体活动)以及接触环境致癌物质和感染(例如乙肝感染或人类乳头状瘤病毒)。在发达国家,使用烟草占有所有恶性肿瘤的30%;饮食造成发达国家约30%和发展中国家20%的癌症。接触致癌物质在发达国家占有所有癌症病例的4%,而接触传染性物质致癌占全世界病例的18%,可见大多数发生在发展中国家。

据世界卫生组织报道，通过实施癌症预防战略可减少多达三分之一的癌症，这些战略的目的在于主要通过下列方法减少暴露于癌症危险：

- (1) 烟草和酒精使用以及饮食和身体活动模式方面的改变
- (2) 针对人类乳头状瘤病毒感染进行免疫接种
- (3) 控制职业危害
- (4) 减少暴露于阳光

表 1.1 肿瘤良、恶性程度的特征与鉴别

特点	恶性	良性
生长特征	侵袭性无止境生长，而且边界不清，无包膜，质地与色泽有别于正常组织，治疗不及时，有转移或复发的倾向。	膨胀性缓慢生长，边界清晰，有包膜，质地与色泽类似正常组织，治疗后，一般不复发。
组织学	核仁分裂增加，核仁粗大数量增加，染色质深染，核膜增厚分化不良，常有异型性出现。	无核仁分裂现象，核仁一般不肿胀，染色质细致，核膜薄，核浆比例增大，分化良好，无明显异常。
代谢特点	代谢异常，特别是核酸代谢加快，物质代谢中的酶谱有不同程度改变	基本均正常，除内分泌腺肿瘤外
影响程度	易危及患病者生命	一般影响不大，极个别除外

如果及早发现和充分治疗，可治愈另三分之一的癌症。癌症的及早发现以这一观察为基础，即癌症发现越早，治疗越为有效。目标是在癌症限于局部时发现它。癌症及早发现由两个部分组成：

- (1) 教育，通过认识癌症早期征兆，例如肿块、疼痛、持续消化不良、持续咳嗽和身体管口出血，以及立即为这些症状寻求医疗的重要性，促进早期诊断。
- (2) 筛查是通过检测手段在征兆可发觉之前查明早期癌症或癌前期患者。筛查检测可用于乳腺癌（乳房X线摄影）和宫颈癌（细胞学检测）等。

可见，肿瘤的早期诊断对肿瘤的治疗和预后有着重要意义。

1.1.2 肿瘤的临床诊断

肿瘤的诊断步骤和方法，与其他疾病基本相似。病史和查体为最基本、最重要的诊断手段，通过全面、系统的病史询问，详尽细致的查体，必要的体验检查及其他特殊检查，然后进行综合分析，在不影响肿瘤的发展和对病人不引起危害的情况下，应尽量获得病理的诊断。

1.1.2.1 病史及查体

病史即对某些进行性的症状，如肿块、疼痛、病理性分泌物、出血、消瘦、黄疸等应深入询问，尤其中年以上患者更应警惕。同一器官发生的不同肿瘤，其好发年龄也不同，如乳癌多好发于经绝期前后妇女，而乳腺纤维瘤则常见于 20~30 岁。病程长短常可提示肿瘤的性质。所以，对病人所述症状，应逐一询问发生的时间、性质和变化程度。了解患者职业、生活环境、有无吸烟等嗜好，有无化学致癌物接触史及癌症家族史等。对曾在其他医疗单位进行过治疗的病人，应询问其治疗经过（包括手术情况和病理报告）。既往史中应详细询问与癌可能有一定关系的疾病，如胃溃疡、结肠息肉、肝硬变、乳头渗血、便血等。女性患者的妊娠、生产、哺乳等也应详细询问。

查体是肿瘤诊断的重要部分，应在全面、系统检查基础上，再结合病史进行重点器官的局部检查。表浅肿瘤容易发现，深部肿瘤仔细查体或借助其他必要的检查，方能确定。检查时必须注意鉴别是真正的肿瘤，或是其他非肿瘤病变（如炎症、寄生虫、器官肥大等）引起的肿块；是良性肿瘤还是恶性肿瘤。局部检查应注意：肿瘤的部位、形态、硬度、活动度及与周围组织关系，同时进行区域淋巴结检查。

1.1.2.2 实验室检查

酶学检查 肿瘤组织中某些酶活性增高,可能与生长旺盛有关;有些酶活性降低,可能与分化不良有关。实验室酶学检查对肿瘤有重要辅助诊断作用。例如肝癌病人在血中 γ -谷氨酰转肽酶、碱性磷酸酶、乳酸脱氢酶和碱性磷酸酶的同功异构酶均可升高[3];骨肉瘤的碱性磷酸酶活性增强而酸性磷酸酶活性弱[4];前列腺癌时酸性磷酸酶可升高[5];肺鳞状细胞癌的脂酶活性随分化程度降低而减弱。

免疫学检查 由于癌细胞的新陈代谢与化学组成都和正常细胞不同,可以出现新的抗原物质。有些恶性肿瘤组织细胞的抗原组成与胎儿时期相似,如原发性肝癌病人血清中出现的甲种胎儿球蛋白(AFP),AFP的特异性免疫检查测定方法是肝癌最有诊断价值的指标[6-8]。结肠癌的血清癌胚抗原(CEA)[9,10];胃癌的胃液硫糖蛋白(FSA)[11]、胃癌相关抗原(GCAA)[12]、 α_2 糖蛋白(α_2 GP)也可作为诊断参考。另一类免疫学检查是用放射免疫或荧光免疫技术检测激素,如绒毛膜上皮癌和恶性葡萄胎的绒毛膜促性腺激素[13,14]。

1.1.2.3 内窥镜检查

凡属空腔脏器或位于某些体腔的肿瘤,大多可相应的内窥镜检查。内窥镜有金属制和纤维光束两类。常用于鼻咽、喉、气管支气管、食管、胃十二指肠、胆道、胰、直肠结肠、膀胱、肾、阴道、宫颈等部位的检查[15-20]。还可以检查腹腔和纵隔等。通过内窥镜可窥视肿瘤的肉眼改变、采取组织或细胞行病理形态学检查;或向输尿管、胆总管或胰管插入导管作X线造影检查。可大大提高肿瘤诊断的准确性。

1.1.2.4 影像学检查

随着医疗诊断技术的发展,诊断仪器更新,各种影像学检查对肿瘤的诊断起着重要作用。包括X线透视、摄片、造影、断层扫描,超声波检查,放射性核

素扫描以及选择性血管造影等等，都可为肿瘤提供确切的定位诊断。

X线检查可确定肿瘤的位置、形状、大小等，并有助于判断肿瘤性质，使用范围广泛，但在肿瘤体积很小时，其准确率可能降低[21-27]。方法有三种：①普通 X 线透视和摄片：常用于肺肿瘤、骨肿瘤，邻近肺部和侵及骨组织的其他肿瘤。②造影检查：适用于肿瘤与正常组织的 X 线对比差的部位，如消化道肿瘤可用钡餐或钡灌肠，可显示肿瘤所在范围钡剂充盈缺损、粘膜破坏；管腔狭窄、管壁破坏等，必要时可用发泡剂或注气作对比，或用山莨菪碱等使平滑肌弛缓（低张），以提高影像清晰度。其他器官的造影大多用碘制剂（泛影葡胺、康瑞液、磺苯指等），以静脉注射、口服、经内窥镜插管或选择性血管插管等方法造影，可显示肾、颅内、胆、肝、胰等的肿瘤。气体也可单独作为造影剂，如气脑造影，腹膜后充气造影等诊断脑、腹膜后的肾、肾上腺肿瘤。③特殊造影：断层摄影和荧光摄影（间接摄影）用于胸部肿瘤；硒静电 X 线和钨靶 X 线球管的摄影用于乳腺肿瘤。电子计算机断层扫描（CT），对深部肿瘤特别是颅内肿瘤与腹腔内实质脏器肿瘤的早期发现及定位很有意义。磁共振显像（MRI）具有对人体无害、无电离辐射，可多方向断层摄影，图象分辨率高等优点。数字减影摄像（DSA）对肿瘤的定位及肿瘤的血供等有价值。以上特殊影像技术应用临床以来，不仅对肝、脑、肺、肾肿瘤有诊断价值，而且对肿瘤在治疗中的疗效观察和随访有效用。

超声波检查是利用肿瘤组织与正常组织或其他病变组织对声抗阻和衰减率的不同，以取得不同的超声反射波型来进行诊断[28-35]。方法简便而无痛苦。常用于肝、肾、脑、子宫和卵巢等肿瘤的诊断和定位，对鉴别囊性或实性肿块有价值。不可以测定胸水、腹水，并间接测定脑中线移位情况。目前常用的灰阶超声波检查更为准确，如对肝内直径在 1.0 cm 以上的占位病变，不但容易发现肝实质异常改变，而且可看到肝静脉、门静脉和肝外胆道的走向、扭曲、挤压、变形等，有利于早期诊断和定位。超声多普勒（Doppler）法可精确了解肿瘤的血供情况。

放射性核素扫描是通过口服或注射某些能特定积聚于某些脏器或肿瘤的放射性核素，然后用一定的仪器（闪烁扫描机和 γ 射线照相机等）在体外追踪其分布情况的方法，已成为检查肿瘤的重要方法[36-41]。常用的放射性核素有 131 碘、198 金、99m 锝、67 镓、87 锶、197 汞、111 铟等 10 余种，可根据检查的

器官组织选择。有的放射性核素分布于正常组织，肿瘤在扫描图上显示放射性稀疏或“冷区”（囊肿等也显示冷区）；有的放射性核素分布于肿瘤细胞组织内多于正常组织，肿瘤在扫描图上显示放射密集区。临床上甲状腺肿瘤、肝肿瘤、骨肿瘤、脑肿瘤等常用放射性核素检查。

1.1.2.5 病理检查

细胞学检查 由于肿瘤细胞较正常细胞容易从原位脱落，故可用各种方法取得瘤细胞和组织颗粒，鉴定其性质[42-46]。例如，用浓集法收集痰、胸水、腹水或冲洗液等细胞；用拉网法收集食管和胃的脱落细胞；用印片法取得表浅的瘤体表面细胞。还可用穿刺法取得比较深在的瘤细胞，进行细胞学检查。但在临床实践中发现有假阳性或阳性率不高的缺点，尚不能完全代替病理组织切片检查。

活体组织检查 通过各种内窥镜活检钳取肿瘤组织；或施行手术切取；或用针穿刺吸取等方法，进行活体组织检查，是决定肿瘤诊断及病理类型准确性最高的方法，适用于一切用其他方法不能确定性质的肿块；或已怀疑呈恶性变的良性肿瘤[47-55]。该检查有一定的损伤作用，可能致使恶性肿瘤扩散，因此，需要时宜在术前短期内或手术中施行。

肿瘤组织细胞一般可用巴氏染色、苏木素伊红染色法染色，还可用组织化学法，如用丫啶橙或猩红等染料显示细胞的DNA和RNA，提高辨别肿瘤细胞的准确率。

1.2 荧光法在肿瘤诊断中的应用概况

荧光光谱和图像技术应用于生物材料鉴别已有几十年历史，荧光显微镜、荧光分光光度计、流体血细胞记数分类计等已成为常规的临床应用技术[56]。而它在肿瘤学上的应用直到20世纪80年代才得到快速发展。

早在1924年，Policard[57]就首次报道了在紫外可见光照射下观察到肿瘤的荧光，此荧光属于内源性的；1942年，Auler[58]等和Figge[59]对动物使用外源性卟啉化合物后观察到其肿瘤的红色荧光。之后，Profio[60]和Kinsey[61]等将带有光

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库