

蛋白质芯片 SELDI-TOF MS 技术的研究进展及其在临床中的应用 Research Progress in SELDI-TOF MS and its Clinical Applications

曹志成*

CHO William Chi-Shing*

香港特别行政区 伊利沙伯医院 临床肿瘤科

Department of Clinical Oncology, Queen Elizabeth Hospital, Hong Kong SAR, China

摘 要 蛋白质芯片为新一代的蛋白质组研究技术,由美国 CIPHERGEN 生物系统公司引进,表面增强激光解吸电离-飞行时间质谱(SELDI-TOFMS)提供一个高通量和高灵敏度的检测平台。投放至今虽短短 10 来年,但卓越成果已广为医学科学界重视,尤其在恶性肿瘤的早期诊断、监控和预后研究上。蛋白质是细胞内执行生物功能的最终分子,蛋白质组学研究让人类更深入地了解疾病和生命的本源,不断发现的特异性肿瘤标志物更为攻克癌症带来新希望。这里除对表面增强激光解吸电离-飞行时间质谱作较详尽的介绍外,更重点阐述其近年来蛋白质芯片近期的研究进展和在临床中的应用,并就其优劣和发展前景作出评估。

关键词 蛋白质芯片,蛋白质组学,肿瘤标志物,表面增强激光解吸电离-飞行时间质谱

中图分类号 Q81 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)06-0871-06

Abstract Proteinchip profiling is a powerful and innovative proteomic technology for biomarker discovery and diagnostic/prognostic assay development. Based on surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF MS), CIPHERGEN's proteinchip system offers a single, unified, high-throughput platform for a multitude of proteomic research applications. Proteins are the major functional components of the cell, the study of proteomics provides mankind with a better understanding of disease and life. The remarkable findings in disease biomarkers have shed light to the early diagnosis, monitoring and predicting prognosis of various diseases, especially for cancer. In this article, the development and technology of SELDI-TOF MS are introduced. Some research progress and encouraging research results in oncoproteomics, infectious diseases, neurological diseases and diabetes mellitus using SELDI-TOF MS are also reviewed. The paper is closed by the appraisals on its pros and cons, as well as the future prospective is also expounded.

Key words proteinchip profiling, proteomics, tumour biomarker, surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (SELDI-TOF MS)

蛋白质乃生命活动的使者,人们设想若能洞悉其奥秘,便能了解疾病发生发展的机理。早于 20 世纪 80 年代末期, Hutchens 与叶大同已开展蛋白质芯片技术的前期研究,20 世纪 90 年代初,蛋白质芯片

技术渐趋成熟^[1],美国 CIPHERGEN 生物系统有限公司的成立,提供了蛋白质芯片系统及相关软、硬件的配套。

1 技术原理

蛋白质指纹技术又称表面增强激光解吸电离-飞行时间质谱 (SELDI-TOF MS) 技术,把色谱分析技术的芯片和质谱集于一身,将传统基质改为以色谱原理设计的蛋白质芯片,增强了分离能力,通过生物或化学原理,芯片表面利用亲和力和来捕获疏水性、亲水性、离子螯合和与金属结合的蛋白质或其它分子,以获得所需蛋白质的分子量、等电点、糖基化位点和磷酸化位点等重要资料。SELDI-TOF MS 利用激光脉冲辐射使芯池中的分析物解吸,形成荷电离子,根据不同质荷比,离子在仪器场中飞行的时间长短不一,由此绘制质谱图,经计算机处理可形成模拟谱图,直接显示样品中各种蛋白质的分子量和含量。将疾病组与对照组的谱图进行比较,能发现和捕获疾病特异性相关蛋白质(图1)。

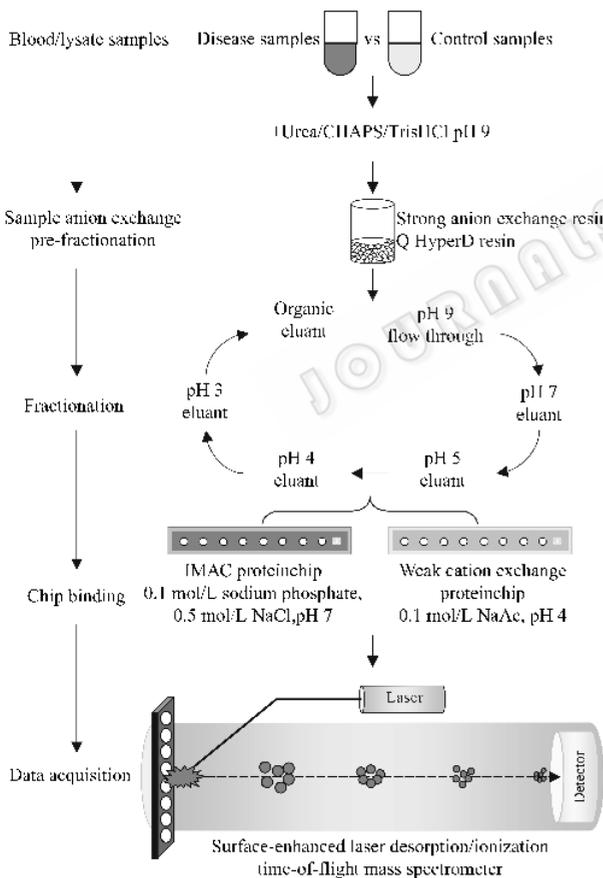


图1 蛋白质芯片技术的样本分离、芯片吸附及数据采集

Fig. 1 Sample fractionation, chip binding and data acquisition in proteinchip profiling

2 生物信息学及统计分析

Ciphergen 蛋白质芯片软件或新出的 Ciphergen Express 分析软件包从各个方面控制了芯片阅读器

PBS 系列或芯片系统 4000 系列,便于数据的采集和分析,具有自动阅读、多重数据比较、可选择谱图显示方式等优点。应用蛋白质芯片软件可轻易获得实验数据,只要输入所需参数,系统就能自动收集数据并显示出被检测物的谱图。为了充分利用收集到的数据,分析软件提供了多种显示方式,包括用来描述蛋白质分子量的扫描谱图、清晰易懂的棒图和模拟凝胶的电泳样谱图。其三维显示方式可以同时评价几个谱图以研究相关峰的微小变化,对研究疾病的发展和药物作用的影响特别适用。蛋白质芯片软件的分析工具可分为单变量和多变量两大类,前者主要包括:

2.1 曼-惠特尼 U 检定 (Mann-Whitney U test)

采用无参数测定来进行不同组别间显著性检验,比较两个随机样本的差异,然后推论到两个母群间的差异,推论的依据是以所有可能样本特性所组成的抽样分配为基础,根据样本中变项分数的等级,计算出检定统计值。

2.2 受试者工作特征 (ROC) 曲线

根据一系列不同的二分类方式(分界值或决定阈),以真阳性率(敏感度)为纵坐标、假阳性率(1-特异度)为横坐标绘制的曲线。ROC 曲线的主要作用有三:(1)能轻易查出任意界限值时对疾病的识别能力;(2)选择最佳的诊断界限值;(3)两种或以上不同诊断试验对疾病识别能力的比较。

2.3 散点图 (Scatter plot)

用于比较跨类别的非重复数值,将数值序列显示为一组点,数值由点在二维图表空间中的位置表示,类别由图表中的不同点表示。

2.4 箱线图 (Box and Whisker plot)

提供一种只用 5 个点数据集做简单的总结方式,这 5 个点包括中值、1/4 值、3/4 值、分布状态的最高位和最低位,形象地分为中心、延伸以及分布状态的全部范围。

单变量分析可捕获个别潜在差异蛋白质标志物,但鉴于生物的复杂性和疾病的多样性,多变量分析有助较彻底的分类和潜藏标志物的发现,多变量分析工具有:

2.5 三维主成分分析 (3D PCA)

对多变量数据矩阵进行最佳综合简化,寻找这些变量的线性组合,称之为主成分,使这些主成分间不相关。为了能用尽量少的主成分个数去反映原始变量间提供的变异信息,要求各个主成分的方差从大到小排列,第一主成分最能反映数据间的差异。

3D PCA 通过合并原来的维数得到更少的维数来表示对象,同时要求新的维数必须尽可能反映原有维数所反映的信息,故较少信息丢失,有助于简化分析和多维数据的可视化。

2.6 热图 (Heat map)

采用分层聚类法将 n 个样品各作为一类,计算 n 个样品两两之间的距离,构成距离矩阵,合并距离最近的两类为一新类,计算新类与当前各类的距离;再合并、计算,直至只有一类为止。热图利用颜色来呈现二维的数组,由于结果的可视化和蛋白质间关系的明确表现,可协助研究人员分析大量复杂数据。

2.7 分类和回归树 (CART)

是 Ciphergen Biomarker Pattern Software 的一种预测模型算法,通过将大量数据有目的地分类,从中找到一些有价值的潜在信息。CART 的主要优点是描述简单、分类速度快,特别适合大规模数据处理,能发现多蛋白质联合标志物,并进行交叉确认,减少分类错误。

3 研究进展及应用

现在 SELDI-TOF MS 已经在各个有关医学研究领域中使用,在识别特定蛋白质的表达物、进行蛋白质水平的药物筛选、揭示蛋白质激酶的作用、蛋白质的翻译后修饰、蛋白质间的相互作用、测定血清中的小分子物质含量等方面均证实准确迅速。

在肿瘤研究方面,已有应用 SELDI-TOF MS 进行了卵巢癌、前列腺癌、肺癌、乳腺癌、鼻咽癌、肝癌、结肠直肠癌、白血病、胃癌、胰腺癌、肾癌、膀胱癌、骨癌、脑癌和喉癌等的临床诊断研究,并取得了可喜的成果。如采用 SELDI-TOF MS 进行测定,发现 5 个蛋白质能有效检出卵巢癌,敏感性达 100%,特异性为 95%,阳性预测值 94%^[2]。另有通过 SELDI-TOF MS 对早期卵巢癌患者血清进行检测,敏感性为 83%,特异性达 94%,提示蛋白质芯片可以对卵巢癌患者进行早期诊断^[3]。应用 SELDI-TOF MS 检测前列腺癌患者血清中特异蛋白质标志物,可有效地将正常人、前列腺癌和良性前列腺肥大患者清楚区分开来^[4]。利用 SELDI-TOF MS 在乳腺癌患者血清中检测到 3 种不同分子量可作为诊断指标的特异蛋白质,其敏感性和特异性分别达到 93% 和 91%^[5]。笔者也曾采用 SELDI-TOF MS 发现肺癌患者与正常对照组血清中存在特异表达蛋白质,此研究成果已成功申请了新美国国际 PCT 专利;亦有研究通过 SELDI-TOF MS 检测肺癌,敏感性和特异性分别高达

93% 和 97%^[6]。此外,利用 SELDI-TOF MS 分析人鼻咽癌血清中蛋白质表达的差异,笔者发现血清淀粉样 A (SAA) 蛋白质在复发性鼻咽癌血清中呈高表达,而在对照组则呈低表达,经 ELISA 确认,证实 SAA 与复发性鼻咽癌密切相关,对鼻咽癌的预后具参考价值^[7]。SELDI-TOF MS 还确认了与肝癌相关的特异性标志蛋白质,研究发现在慢性丙型肝炎-相关肝癌中补体 C3a 蛋白质呈现过高表达^[8]。另一方面,通过 SELDI-TOF MS 检测结直肠癌差异蛋白质标志物,敏感性和特异性分别达到 92% 和 89%^[9];更有实验证明 Calgizzarin 蛋白质能有效区分结肠直肠癌和结肠腺瘤^[10]。已证实苯与白血病的发生有关,应用 SELDI-TOF MS 检测受影响的鞋厂工人,发现其血清中的 PF4 和 CTAP-III 蛋白质呈低表达,或可作为苯相关白血病的潜在生物标记^[11]。

其它疾病研究还包括有传染病、神经系统病、慢性肾病、移植排斥检测、类风湿性关节炎、糖尿病及心血管疾病,虽然尚未普及,但一些结果亦非常令人鼓舞。

在传染病研究方面,已有应用 SELDI-TOF MS 进行了艾滋病、严重急性呼吸道综合征 (SARS)、鼠疫杆菌、分支杆菌、柄细菌、链球菌、肉毒中毒和黑死病毒等的研究。如采用 SELDI-TOF MS 发现部分艾滋病患者体内存在一种名为 α -defensins 的蛋白质,能对艾滋病病毒产生抑制作用,这发现有可能帮助人类找到有效治疗艾滋病的方法。采用 SELDI-TOF MS 可同时检测多种疾病特异性抗原的分子量及进行窗口期检查,例如对 SARS 和烈性传染病鼠疫,在发病早期即可进行病原体的诊断;笔者更应用蛋白质芯片发现 SAA 能作为 SARS 患者严重程度的监察生物标志^[12]。

在神经系统病研究方面,已有应用 SELDI-TOF MS 进行了老人痴呆症、忧郁症和精神分裂症等研究。如应用 SELDI-TOF MS 检测脑脊液,证明 β -淀粉样多肽片段 (β -amyloid peptide) 在神经元中的沉积是导致老人痴呆症发病的主要原因,并确定了抗原变异片段,该生物标志物可作为诊断的主要参考指标,为早期诊断和治疗提供依据^[13];另有通过 SELDI-TOF MS 发现 5 个特异性蛋白质与老人痴呆症密切相关^[14]。

应用 SELDI-TOF MS 从慢性肾病患者中检测到的一种 Lipocalin 型前列腺素 D 合成酶 (L-PGDS) 对诊断有特殊意义。通过 SELDI-TOF MS 对尿液进行检查,可鉴定急性肾移植排斥反应,不但无创伤性,

还可 24h 不间断地监测病情变化,这对肾移植后免疫抑制剂用量的调整、并发症与疗效判断有重大意义,也将对其它移植技术的精密组织配型、疗效判断、并发症的研究提供重大参考价值。SELDI-TOF MS 在类风湿性关节炎也有发现,已捕获一系列相关蛋白质标志物^[15]。

此外,SELDI-TOF MS 在糖尿病及心血管疾病诊断方面也取得了重大突破,可监控糖尿病及心血管病的并发症,能及早发现动脉粥样硬化和心肌梗塞,更可区别缺血性和出血性脑卒中。笔者就曾以 SELDI-TOF MS 追踪不同病情期的糖尿病大鼠,发现

了一些与糖尿病及其并发症相关的生物标志,如胰岛淀粉样多肽和抵抗素^[16,17],更鉴于人参皂甙 Re 治疗糖尿病的功效,用蛋白质芯片检测出与其疗效相关的 C-反应蛋白质^[18]。

SELDI-TOF MS 可用以探索蛋白质生物标志物,使之成为有用的前期诊断方法,并能洞察疾病的发展趋势。这种高科技分析技术已广泛应用于美国食品与药品管理局早期肿瘤诊断研究,被公认为一种新的有效前期诊断试验方法。对某些疾病,特别是癌症相关蛋白质的识别上取得了一系列突破性进展(表 1)。

表 1 蛋白质芯片与肿瘤标志物的检测结果对比

Table 1 Comparison of proteomic biomarkers and current tumour markers

恶性肿瘤 Cancer	蛋白质芯片 Proteinchip		肿瘤标志物 Current tumour marker		
	敏感性 Sensitivity	特异性 Specificity	标志物 Marker	敏感性 Sensitivity	特异性 Specificity
膀胱癌 ^[28,29] Bladder	80%	90-97%	NMP22	31%	95%
乳腺癌 ^[30,31] Breast	93%	91%	CA15-3	58%	96%
结肠直肠癌 ^[32,33] Colorectum	91%	93%	CEA	43%	* * * *
胃癌 ^[34,35] Stomach	83%	95%	CEA	31%	* * * *
肝癌 ^[36,37] Liver	94%	86%	AFP	50%	70%
肺癌 ^[38,39] Lung	87%	80%	Cyfra21-1	63%	94%
卵巢癌 ^[40,41] Ovary	83%	94%	CA-125	58%	91%
胰腺癌 ^[42,43] Pancreas	78%	97%	CA19-9	75%	80%
前列腺癌 ^[44,45] Prostate	83%	97%	PSA	46%	91%

4 优劣评估

蛋白质芯片的应用层面广泛,可以直接检测粗样品,如血液、尿液、脑脊液、关节腔滑液、唾液、胃液、支气管洗脱液、各种分泌物和细胞裂解液等,具高通量筛选、高灵敏度检测、全自动化操作、样品需求量少、低丰度粗样品等优点,为目前最具临床潜质的分子诊疗手段之一^[19-22]。

蛋白质芯片及相关试剂较昂贵,检测一个样品约需耗材成本人民币 175 元左右(未计设备成本),因此要完成建模及对模型的评估,需投入的实验成本比较高,限制了大规模研究的普及性。另一方面,尽管蛋白质生物系统有着全自动化的操作程序,但由于样品的多样化,要选择合适的试剂和正确的参数,需要经验丰富的研究人员。正因如此,SELDI-TOF MS 的重复性往往备受关注。为了解决这一难题,一些实验计划采取多单位同时和/或分期进行,以确保研究结果的一致性,如此一来,本来已耗费不菲的成本就更令许多单位望而却步了^[23]。

另一方面,蛋白质芯片虽能寻找疾病特异性标志物,但蛋白质身份鉴定仍是其瓶颈。近年研发的 SELDI-TOF MS 结合基质辅助激光解析电离-飞行时间质谱,如 Q-STAR 可优化蛋白质身份鉴定流程,有助发现蛋白质或多肽,对日后确认和推向临床应用大有裨益。还有,纵使 SELDI-TOF MS 已灵活运用色谱分析原理以筛选蛋白质,惜血清中含大量高丰度蛋白质,如白蛋白和免疫球蛋白等,为血清蛋白质组学研究的障碍,有鉴于此,新开发的深入蛋白质组(Deep proteome)研究和运用于疾病组织上的激光显微捕获技术,可以更有效地发掘疾病中的特异性蛋白质^[24-26]。

5 展望

虽然 SELDI-TOF MS 推出仅 10 数年,但从世界各地的应用结果来看,它在许多疾病的诊断,特别在肿瘤早期诊断上有着远大的应用前景。蛋白质芯片具有高通量、大规模和平行性地分析蛋白质状况的能力,利用其进行药物筛选、药物活性和毒理研究,

能缩短药物筛选所用时间,并大大提高新药研发和药理研究的效率。

蛋白质芯片的成熟和应用一方面将为本世纪的疾病诊断和治疗、新药开发、分子生物学、司法鉴定、食品卫生、环境监测、农产品育种和改良等领域带来一场革命;另一方面则为人类提供了能够对个体生物信息进行高速、并行采集和分析的强有力技术手段,必将成为未来生物信息学研究中的重要信息采集和处理平台。目前蛋白质组学研究已具卓越进展,希望能尽快建立完备的蛋白质组数据库,筛选出重大疾病的标志蛋白质和关键蛋白质组,实现疾病的早期诊断和预警。

分子靶向治疗已成为治疗疾病的热点,以 SELDI-TOF MS 捕获的特异性蛋白质标志物,联合串联质谱技术,使其标识出新的蛋白质后能迅速测出氨基酸序列,将会是科研和制药的有效工具,为人类攻克疾病开辟出一条新的路径。未来 SELDI-TOF MS 最大市场是诊断试剂领域,但由于研发成本高,价格也较高,目前尚难以大规模向市场推广。尽管 SELDI-TOF MS 未来发展之路不尽平坦,但其在生物标记诊断、疾病机制分析及药物筛选等方面已呈现广阔的应用前景。蛋白质芯片发展到今天不过短短 10 多年时间,随着研究的不断深入和技术的更臻完备,定能在生命科学研究领域发挥出非凡贡献^[27]。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Hutchens TW, Yip TT. New desorption strategies for the mass spectrometric analysis of macromolecules. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1993, **7**: 576 - 580
- [2] Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA *et al.* Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet*, 2002, **359** (9306): 572 - 577
- [3] Zhang Z, Bast RC Jr, Yu Y *et al.* Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Research*, 2004, **64**(16): 5882 - 5890
- [4] Petricoin EF 3rd, Omstein DK, Paweletz CP *et al.* Serum proteomic patterns for detection of prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 2002, **94**(20): 1576 - 1578
- [5] Li J, Zhang Z, Rosenzweig J *et al.* Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clinical Chemistry*, 2002, **48**(8): 1296 - 1304
- [6] Xiao X, Liu D, Tang Y *et al.* Development of proteomic patterns for detecting lung cancer. *Disease Markers*, 2003 - 2004, **19**(1): 33 - 39
- [7] Cho WC, Yip TT, Yip C *et al.* Identification of serum amyloid A protein as a potentially useful biomarker to monitor relapse of nasopharyngeal cancer by serum proteomic profiling. *Clinical Cancer Research*, 2004, **10**(1): 43 - 52
- [8] Lee IN, Chen CH, Sheu JC *et al.* Identification of complement C3a as a candidate biomarker in human chronic hepatitis C and HCV-related hepatocellular carcinoma using a proteomics approach. *Proteomics*, 2006, **6**(9): 2865 - 2873
- [9] Yu JK, Chen YD, Zheng S. An integrated approach to the detection of colorectal cancer utilizing proteomics and bioinformatics. *World Journal of Gastroenterology*, 2004, **10**(21): 3127 - 3131
- [10] Mele C, Ernst G, Schimmel B *et al.* Different expression of calgizzarin (S100A11) in normal colonic epithelium, adenoma and colorectal carcinoma. *International Journal of Oncology*, 2006, **28**(1): 195 - 200
- [11] Vermeulen R, Lan Q, Zhang L *et al.* Decreased levels of CXC-chemokines in serum of benzene-exposed workers identified by array-based proteomics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, **102**(47): 17041 - 17046
- [12] Yip TT, Chan JW, Cho WC *et al.* Protein chip array profiling analysis in patients with severe acute respiratory syndrome identified serum amyloid A protein as a biomarker potentially useful in monitoring the extent of pneumonia. *Clinical Chemistry*, 2005, **51**(1): 47 - 55
- [13] Austen BM, Frears ER, Davies H. The use of SELDI proteinchip arrays to monitor production of Alzheimer's beta amyloid in transfected cells. *Journal Peptide Science*, 2000, **6**(9): 459 - 469
- [14] Ruetschi U, Zetterberg H, Podust VN *et al.* Identification of CSF biomarkers for frontotemporal dementia using SELDI-TOF. *Experimental Neurology*, 2005, **196**(2): 273 - 281
- [15] de Seny D, Fillet M, Meuwis MA *et al.* Discovery of new rheumatoid arthritis biomarkers using the surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry ProteinChip approach. *Arthritis and Rheumatism*, 2005, **52**(12): 3801 - 3812
- [16] Cho WC, Yip TT, Chung WS *et al.* Differential expression of proteins in kidney, eye, aorta, and serum of diabetic and non-diabetic rats. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2006a, **99**(1): 256 - 268
- [17] Cho WC, Yip TT, Chung WS *et al.* Potential biomarkers found by proteomic profiling may provide insight for the macrovascular pathogenesis of diabetes mellitus. *Disease Markers*, 2006b, **22**(3): 153 - 166
- [18] Cho WC, Yip TT, Chung WS *et al.* Altered expression of serum protein in ginsenoside Re treated diabetic rats detected by SELDI-TOF MS. *Journal of Ethnopharmacology*, 2006c, doi: 10.1016/j.jep.2006.05.009
- [19] Fung ET, Thulasiraman V, R Weinberger SR *et al.* Protein biochips for differential profiling. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, **12**(1): 65 - 69
- [20] Issaq HJ, Veenstra TD, Conrads TP *et al.* The SELDI-TOF MS approach to proteomics: protein profiling and biomarker identification. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2002, **292**(3): 587 - 592
- [21] Yanagisawa K, Shyr Y, Xu BJ *et al.* Proteomic patterns of tumour subsets in non-small-cell lung cancer. *Lancet*, 2003, **362**(9382):

- [22] Henderson NA, Steele RJ. SELDI-TOF proteomic analysis and cancer detection. *Surgeon*, 2005, **3**(6) 383 – 390, 422
- [23] Wong DT. Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. *Journal of the American Dental Association*, 2006, **137**(3) 313 – 321
- [24] Annalisa C, Daniela C, Lau S *et al.* Exploring the hidden human urinary proteome via ligand library beads. *Journal of Proteome Research*, 2005, **4**(6) :1917 – 1930
- [25] Chen EI, Hewel J, Felding-Habermann B *et al.* Large scale protein profiling by combination of protein fractionation and multidimensional protein identification technology (MudPIT). *Molecular and Cellular Proteomics*, 2006, **5**(1) 53 – 56
- [26] Thulasiraman V, Lin S, Gheorghiu L *et al.* Reduction of the concentration difference of proteins in biological liquids using a library of combinatorial ligands. *Electrophoresis*, 2005, **26**(18) : 3561 – 3571
- [27] CHO WC(曹志成), YUE KM(余坚文), LEUNG WN(梁荣能). Proteomics--leading the post-genome era. *Chinese Biotechnology* (中国生物工程杂志), 2005, **25**(1) 33 – 38
- [28] Mueller J, von Eggeling F, Driesch D *et al.* ProteinChip technology reveals distinctive protein expression profiles in the urine of bladder cancer patients. *European Urology*, 2005, **47**(6) 885 – 894
- [29] Mahnert B, Tauber S, Kriegmair M *et al.* Measurements of complement factor H-related protein (BTA-TRAK assay) and nuclear matrix protein(NMP22 assay)-useful diagnostic tools in the diagnosis of urinary bladder cancer? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2003, **41**(1) :104 – 110
- [30] Li J, Zhang Z, Rosenzweig J *et al.* Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clinical Chemistry*, 2002, **48**(8) :1296 – 1304
- [31] Ciambellotti E, Coda C, Lanza E. Determination⁺⁺ of CA 15-3 in the control of primary and metastatic breast carcinoma. *Minerva Medica*, 1993, **84**(3) :107 – 112
- [32] Chen YD, Zheng S, Yu JK *et al.* Artificial neural networks analysis of surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectra of serum protein pattern distinguishes colorectal cancer from healthy population. *Clinical Cancer Research*, 2004, **10**(24) 8380 – 8385
- [33] Grotowski M, Wojtun S. CEA, CA-19-9 and IL-8, sTNFR^{II} and sIL-2R in persons at high risk of colorectal cancer. *Polski Merkuriusz Lekarski*, 2003, **14**(82) 327 – 330
- [34] Poon TC, Sung JJ, Chow SM *et al.* Diagnosis of gastric cancer by serum proteomic fingerprinting. *Gastroenterology*, 2006, **130**(6) : 1858 – 1864
- [35] Lai IR, Lee WJ, Huang MT *et al.* Comparison of serum CA72-4, CEA, TPA, CA19-9 and CA125 levels in gastric cancer patients and correlation with recurrence. *Hepatogastroenterology*, 2002, **49**(46) :1157 – 1160
- [36] Ward DG, Cheng Y, N'Kontchou G *et al.* Changes in the serum proteome associated with the development of hepatocellular carcinoma in hepatitis C-related cirrhosis. *British Journal of Cancer*, 2006, **94**(2) 287 – 292
- [37] De Masi S, Tosti ME, Mele A. Screening for hepatocellular carcinoma. *Digestive and Liver Disease*, 2005, **37**(4) 260 – 268
- [38] Yang SY, Xiao XY, Zhang WG *et al.* Application of serum SELDI proteomic patterns in diagnosis of lung cancer. *BMC Cancer*, 2005, **5** 83
- [39] Li R, Li R, Wang Y. Clinical usefulness of a new tumor marker CYFRA21-1 in patients with lung cancer. *Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases*, 1998, **21**(1) 26 – 29
- [40] Zhang Z, Bast RC Jr, Yu Y *et al.* Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Research*, 2004, **64**(16) 5882 – 5890
- [41] Brazert J, Pietryga M, Szablonski W *et al.* Diagnostic value of the morphological ultrasound score system and the serum concentration of CA 125 in the diagnosis of malignant ovarian cancer. *Ginekologia Polska*, 2003, **74**(12) :1542 – 1548
- [42] Koopmann J, Zhang Z, White N *et al.* Serum diagnosis of pancreatic adenocarcinoma using surface-enhanced laser desorption and ionization mass spectrometry. *Clinical Cancer Research*, 2004, **10**(3) 860 – 868
- [43] Yamaguchi K, Nagano M, Torada N *et al.* Urine diacetylspermine as a novel tumor marker for pancreatobiliary carcinomas. *Rinsho Byori*, 2004, **52**(4) 336 – 339
- [44] Adam BL, Qu Y, Davis JW *et al.* Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer Research*, 2002, **62**(13) 3609 – 3614
- [45] Gann PH, Hennekens CH, Stampfer MJ. A prospective evaluation of plasma prostate-specific antigen for detection of prostatic cancer. *Journal of the American Medical Association*, 1995, **273**(4) 289 – 294