

[文章编号] 1007-385X(2002)03-0227-02

生物芯片技术在肿瘤研究中的应用进展

姚天明¹, 韩冰¹综述, 张晓晖²审阅 (1. 第四军医大学学员旅十四队, 西安 710032; 2. 第四军医大学西京医院病理科, 西安 710033)

[摘要] 生物芯片技术是近年来发展起来的一种新型生物技术, 该技术使基因分析效率提高千万倍, 所用样品和试剂相应大大减少, 试验结果更具全面、直观和可重复性。该技术为肿瘤发生发展过程中基因表达情况的分析提供了一个有力的工具。

[关键词] 生物芯片; 基因表达谱; 肿瘤

[中图分类号] R73-3 [文献标识码] A

1 生物芯片的原理

生物芯片也称基因微矩阵 (Microarray), 是 90 年代发明的高效率核酸分析技术之一^[1], 是将靶基因片段按矩阵高密度固定在玻璃、硅片等载体上, 待测样品经荧光染料标记制成探针与芯片杂交, 杂交信号用激光扫描仪检测, 计算机分析结果。其基本原理就是碱基互补配对和分子杂交。

生物芯片技术是通过类似于集成电路制作过程中半导体加工的微缩技术, 将生命科学研究中许多不连续的分析过程, 如样本制备, 生化反应和定性、定量检测等手段连续化、微型化, 将现在需要几个实验室完成的工作, 集中到指甲盖大小的芯片上, 使基因分析过程全自动化。

目前认为肿瘤的发生和发展是一个复杂的多阶段的过程, 实际上是多种肿瘤相关基因表达失常或许多肿瘤抑制基因失活所致, 正常基因的突变或缺失, 癌基因的异常扩增和表达以及多个基因的协同作用, 基因本身的多效性和机体免疫因素, 决定最终肿瘤表型的表达与否^[2]。生物芯片为研究肿瘤发生发展中的基因开关和表达程度提供了强有力的工具, 利用它可随时获得肿瘤细胞生长各期与肿瘤相关基因的表达模式, 生物芯片在肿瘤研究领域中具有非常重要的应用价值。

2 生物芯片在肿瘤基因表达谱研究中的应用

基因表达 mRNA 的水平反映了在不同环境、细胞类型、细胞生长阶段和细胞状态下的功能信息, 分析所有基因的表达谱对于研究基因的功能十分重要, 利用表达谱芯片大规模、高通量及并行处理的优点, 可以绘制一张反映正常、异常和受控条件下所有基因表达的时空图, 使人类的基因研究从一维走向多维, 并且通过生物信息学方法, 对各基因的表达进行比较和统计分析。在肿瘤基因表达谱的研究中, 研究者们发现, 利用生物芯片表达谱数据可随时获取肿瘤细胞生长各期与肿瘤生长相关基因的表达模式^[3]。黄达藩等^[4]用包含 4 096 个 cDNA 基因表达谱芯片研究一组肺癌组织样本的基因表达谱, 结果共筛选出差异表达的基因 370 条, 包含已

知基因 146 条, 未知基因中 107 条表达增加, 263 条表达降低。

Kononen 等^[5]用含有 4 000 条已知基因和 2 000 条 EST 的 cDNA 芯片对 2 株分别是激素依赖 (CWR22) 和非依赖前列腺癌细胞 (CWR22R) 进行芯片杂交, 将其表达谱与 269 例前列腺癌 (包括正常前列腺组织, 临床局限性肿瘤病灶及复发肿瘤) 组织芯片表达谱进行比较, 研究这些基因是否也在体内组织中表达, 以探索相关新基因在临床前列腺癌中的作用。在芯片 5 148 条基因中, 有 3 条基因 (0.7%) 在 CWR22R 细胞中表达超过 CWR22 细胞表达水平的 2 倍, 有 135 条基因 (2.6%) 下调超过 50%, 其中上调的 IGFBP2 和 HSP27 基因在临床激素抵抗复发肿瘤标本中分别有 100% 和 31% 也是上调的。

陈菊祥等^[6]用一步法抽提喉鳞癌和对照喉正常组织的总 RNA 并纯化 mRNA; 将 4 069 种人类基因 PCR 产物用 Cartesian Pixsys 7500 点样仪按微矩阵排列点样于化学涂层的载玻片上, 制成生物芯片; 将等量的对照组织和喉鳞癌组织 mRNA 分别逆转录合成荧光分子掺入的 cDNA 链做探针, 混合后杂交的上述生物芯片经严格洗片后用 ScanArray3000 扫描仪扫描芯片荧光信号图像, 计算机分析后比较两种组织中差异表达的基因。结果在 4 069 条基因中, 喉鳞状细胞癌与喉正常组织间存在差异表达的基因。所检测的 4 例临床标本中, 2 例共有的差异基因 211 ~ 356 条 (5.15% ~ 8.87%), 3 例共有的差异表达基因 36 条 (0.88%), 证实了喉鳞癌中基因改变的多样性。

Moch 等^[7]对人肾细胞癌细胞株 CRL-1933 和正常肾细胞组织进行表达谱芯片杂交。在肾细胞癌中有 89 条基因差异表达, 其中有一条编码波形蛋白基因, 随后利用免疫组织化学技术对 532 例肾细胞癌组织中的波形蛋白基因表达进行研究, 发现其与患者的预后呈显著的负相关, 而与肿瘤的分级和分期无关。Wang 等^[8]和 Chuaqui 等^[9]对卵巢所进行的 DNA 表达谱芯片研究也得出了类似结果。

这些实验结果表明利用微矩阵生物芯片技术研究肿瘤基因表达谱, 能迅速发现在肿瘤中差异表达的基因, 从而实现高通量并进行分析, 最终发现肿瘤相关的一组基因及其

基因表达谱,深入研究肿瘤发生机制的同时,为临床诊断及治疗提供更全面可靠的指导。

3 生物芯片在肿瘤分子的精确病理分型中的应用

目前对各种类型的肿瘤鉴别主要依靠光镜所见,但这种方法的明显不足之处在于一些组织病理学相似的肿瘤在治疗方法和临床转归上有着明显的差别,应用生物芯片技术可对肿瘤进行分类。

对肿瘤分类方法的研究可以分成两类,一类是发掘肿瘤类型,即确定以前未被认识的肿瘤类型;另一类是预测肿瘤类型,即将特定的肿瘤标本归于已定义的可以反映当前状况和预后的肿瘤类型中。Golub 等^[10]分析了 27 例急性粒细胞白血病(AML)和 11 例急性淋巴细胞白血病(ALL)的组织标本中 1 100 个可表达基因。计算机根据其中 50 个基因的表达水平可以将 38 例样本中的 36 例分成 AML 和 ALL 2 组,来自于对照实验室的 34 例急性白血病的骨髓和外周血标本,虽应用了不同的标本处理方法,但计算机也能对其中 29 例进行分型预测。在测试其方法时还观察到 1 例被诊为 AML 但具有不典型细胞形态的骨髓标本,计算机不能将其归入 AML 或 ALL。进一步观察发现,淋巴细胞和粒细胞特异性基因表达水平均未有显著增高,细胞遗传学分析显示了此肿瘤具有腺泡状横纹肌肉瘤特征性的染色体异位。该例证表明了以生物芯片为基础的肿瘤诊断和分型的潜在价值,应用此方法可以探索基因表达与患者生存时间和对治疗反应的相关性。

4 生物芯片在肿瘤基因突变研究中的应用

不论疾病的病理变化涉及的是单基因或是多基因病变,都可以从病理或健康细胞或组织中基因的差异表达中发现致病基因的线索。从正常人的基因组中分离出 DNA 并与 DNA 芯片进行杂交,获得标准图谱;从受检者基因组中分离 DNA 并进行杂交就可得到病变图谱,通过两种图谱的比较、分析就可以得到病变的 DNA 信息。它不仅准确地确定突变位点和突变类型,更主要的是它的快速高效是目前直接测序所无法比拟的。

Nacia 等^[11]用 DNA 芯片检测遗传性乳腺癌和卵巢癌基因 BRCA1 和第 11 外显子长度为 3.45 kb 的基因突变,突变方式包括点突变,插入及缺失等。在 20 例对照样品中均未发现假阳性情况。使用这种芯片一次即可检出 BRCA1 基因的所有突变位点。

5 小结

微矩阵生物芯片在肿瘤研究中有不足之处,如 Northern 杂交出的差异表达基因经 Microarray 筛选有可能漏检。为此 Yang 等^[12]提出通过改善杂交条件提高信号与背景噪音比值和限定数据的统计分析,从而可以提高鉴别微拷贝 mRNAs 和小片段克隆的鉴别能力。另有一些学者将生物芯

片技术与差异表达技术有机地结合,通过对两种组织进行差异比较,提供差异表达基因的浓聚库,将这些克隆 DNA 点到生物芯片上,可以同时、快捷、重复的筛查上万种 DNA 分子,从而达到高效率、高容量、低成本的筛查和分析差异表达基因的目的,为研究在肿瘤发生、发展过程中各个环节和阶段相互协调、共同表达的基因群提供了有力的工具,也使快速寻找和研究肿瘤相关性基因成了可能。

肿瘤的发生是多基因参与,多阶段的过程。目前肿瘤的治疗尚未取得重大突破,其中主要就是因为各种恶变细胞的分化程度不同,生物学特性复杂以及肿瘤发生癌变的机制不清。因此,通过生物芯片筛选和检测在肿瘤形成中差异表达的基因,不但可以从病理上寻找病因,同时也为早期诊断和预后判断提供依据,并针对肿瘤组织内特有的基因变异情况进行修复或促进肿瘤凋亡,从而探索新的治疗途径。生物芯片技术在临床上的应用将为在整个生命期预防疾病提供一个路标图^[13],促进生命科学研究,造福人类健康。

[参考文献]

- [1] Ramsay G. DNA chips: State of the art [J]. *Nat Biotechnol*, 1998, 16(1): 40-44.
- [2] Bucher P. Regulatory elements and expression profiles [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 1999, 9(3): 400-407.
- [3] Galitski T, Saldanha AJ, Styles CA, et al. Ploidy regulation of gene expression [J]. *Science*, 1999, 285(5425): 251-254.
- [4] 黄达蕾, 田立峰, 戴建凉, 等. 肺癌相关基因的表达谱研究 [J]. *第二军医大学学报*, 2000, 21(9): 827-830.
- [5] Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high throughput molecular profiling of tumor specimens [J]. *Nat Med*, 1998, 4(7): 844-847.
- [6] 陈菊祥, 范静平, 应康, 等. 微矩阵生物芯片筛选喉癌相关基因的研究 [J]. *第二军医大学学报*, 2000, 21(9): 823-826.
- [7] Moch H, Schraml P, Bubendorf L, et al. High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma [J]. *Am J Pathol*, 1999, 154(4): 981-986.
- [8] Wang K, Gan L, Jeffery E, et al. Monitoring gene expression profile changes in ovarian carcinoma using cDNA microarray [J]. *Gene*, 1999, 229(1-2): 101-108.
- [9] Chuaqui RF, Cole KA, Emmert BM, et al. Histopathology and molecular biology of ovarian epithelial tumors [J]. *Ann Diagn Pathol*, 1998, 2(3): 195-207.
- [10] Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al. Molecular classification of cancer: Class discovery and class prediction by gene expression monitoring [J]. *Science*, 1999, 286(15): 531-537.
- [11] Hacia JG. Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays [J]. *Nat Genet*, 1999, 21(1 Suppl): 42-47.
- [12] Yang GP, Ross DT, Kuang WW, et al. Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes [J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(6): 1517-1523.
- [13] Hacia JG, Makalowski, Edgemon K, et al. Evolutionary sequence comparisons using high-density oligonucleotide arrays [J]. *Nat Genet*, 1998, 18(2): 155-158.

[收稿日期] 2002-02-22

[修回日期] 2002-07-20