

- [6] Li R, Harada T, Honjoh K, et al. Phylogenetic analysis and Shiga toxin production profiling of Shiga toxin-producing/enterohemorrhagic *Escherichia coli* clinical isolates[J]. *Microb Pathog*, 2010, 49(5): 246-251.
- [7] Acosta J, Catalan M, del Palacio-Pérez-Medel A, et al. Prospective study in critically ill non-neutropenic patients: diagnostic potential of (1,3)- β -D-glucan assay and circulating galactomannan for the diagnosis of invasive fungal disease[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2012, 31(5): 721-731.
- [8] Bullman S, Lucey B, Sleator RD. Molecular diagnostics: the changing culture of medical microbiology[J]. *Bioeng Bugs*, 2012, 3(1): 1-7.
- [9] Katano H, Kano M, Nakamura T, et al. A novel real-time PCR system for simultaneous detection of human viruses in clinical samples from patients with uncertain diagnoses[J]. *J Med Virol*, 2011, 83(2): 322-330.
- [10] Romanelli AM, Sutton DA, Thompson EH, et al. Sequence-based identification of filamentous basidiomycetous fungi from clinical specimens: a cautionary note[J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(3): 741-752.
- [11] Stürenburg E. Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from clinical samples: methods, effectiveness and cost considerations[J]. *Ger Med Sci*, 2009, 6(1): 7.
- [12] Insa R, Marin M, Martín A, et al. Systematic use of universal 16S rRNA gene polymerase chain reaction (PCR) and sequencing for processing pleural effusions improves conventional culture techniques[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2012, 91(2): 103-110.
- [13] Chowdhury IH, Sen A, Bahar B, et al. A molecular approach to identification and profiling of first-line-drug-resistant mycobacteria from sputum of pulmonary tuberculosis patients[J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(6): 2082-2084.
- [14] Li W, Matsuoka M, Kai M, et al. Real-time PCR and high-resolution melt analysis for rapid detection of *Mycobacterium leprae* drug resistance mutations and strain types[J]. *J Clin Microbiol*, 2012, 50(3): 742-753.
- [15] Söderquist B, Neander M, Dienus O, et al. Real-time multiplex PCR for direct detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in clinical samples enriched by broth culture[J]. *APMIS*, 2012, 120(5): 427-432.
- [16] Woodford N. Rapid characterization of beta-lactamases by multiplex PCR[J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 642(1): 181-192.
- [17] Mark A, Miller MA, Chong G, et al. Comparison of PCR and culture for screening of vancomycin-resistant *Enterococci*: highly disparate results for vanA and vanB[J]. *J Clin Microbiol*, 2009, 47(12): 4136-4137.
- [18] Hoek KG, Van Rie A, van Helden PD, et al. Detecting drug-resistant tuberculosis: the importance of rapid testing[J]. *Mol Diagn Ther*, 2011, 15(4): 189-194.
- [19] McLoughlin KS. Microarrays for pathogen detection and analysis[J]. *Brief Funct Genomics*, 2011, 10(6): 342-353.
- [20] Balmer O, Tanner M. Prevalence and implications of multiple-strain infections[J]. *Lancet Infect Dis*, 2011, 11(11): 868-878.
- [21] Cohen Stuart J, Dierikx C, Al Naiemi N, et al. Rapid detection of TEM, SHV and CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae using ligation-mediated amplification with microarray analysis[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65(7): 1377-1381.
- [22] Peterson G, Bai J, Nagaraja TG, et al. Diagnostic microarray for human and animal bacterial diseases and their virulence and antimicrobial resistance genes[J]. *J Microbiol Methods*, 2010, 80(3): 223-230.
- [23] Zhu H, Cox E, Qian J. Functional protein microarray as molecular decathlete: a versatile player in clinical proteomics[J]. *Proteomics Clin Appl*, 2012, 6(11/12): 548-562.
- [24] Seng P, Rolain JM, Fournier PE, et al. MALDI-TOF-mass spectrometry applications in clinical microbiology[J]. *Future Microbiol*, 2010, 5(11): 1733-1754.
- [25] Matsumoto M, Shigemura K, Shirakawa T, et al. Mutations in the *gyrA* and *parC* genes and in vitro activities of fluoroquinolones in 114 clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* derived from urinary tract infections and their rapid detection by denaturing high-performance liquid chromatography[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2012, 40(5): 440-444.
- [26] Chen Z, Trivedi HM, Chhun N, et al. Using DGGE and 16S rRNA gene sequence analysis to evaluate changes in oral bacterial composition[J]. *Chin J Dent Res*, 2011, 14(2): 95-103.

(收稿日期: 2012-08-09)

• 综 述 •

基因表达谱在肿瘤防治研究及临床应用中的进展*

孟爽爽 综述, 张艳亮, 段 勇[△] 审校

(昆明医科大学第一附属医院检验科, 云南昆明 650003)

关键词: 基因; 基因表达谱; 肿瘤; 微阵列技术

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.07.036

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)07-0829-03

肿瘤是威胁人类健康的主要疾病之一, 每年都有超过 1 千万人诊断为肿瘤, 并且有 760 万人死于肿瘤^[1]。单个基因的异常并不足以引起肿瘤, 现已证实多阶段多基因的异常的遗传累积作用是各型肿瘤发生和发展的主要因素^[2]。由于多种基因

组基因的畸变, 在同一个肿瘤内, 存在多种基因不同的细胞亚群^[3]。这种多基因的畸变导致不同基因表达水平的不同, 研究不同基因在肿瘤发生、发展中的变化, 不仅可以初步探究肿瘤发生的机制, 同时也可以为早期诊断和预后提供依据。基因表

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81160292)。 作者简介: 孟爽爽, 女, 在读研究生, 主要从事分子生物学和生物化学研究。

[△] 通讯作者, E-mail: duanyong992003@yahoo.com.cn。

达谱是指细胞内所有 mRNA 的总和,某种 mRNA 的量的多少可以反映出此基因的表达强度。利用这一高通量的分析技术,可以同时检测人类所有基因在不同组织或同一组织不同亚型之间的差异表达水平。本文就基因表达谱技术在恶性肿瘤中的应用综述如下。

1 基因表达谱技术的方法

1.1 cDNA 微阵列 Schena 等^[4]首次用 cDNA 微阵列技术测定拟南芥基因的表达情况,将完整基因或者是表达序列标签(EST)固定在微型玻璃板上,将待分析样品的 mRNA 逆转录为用荧光标记的 cDNA,与之杂交,通过与内参基因表达强度比较,即可得到分析基因的表达强度。不同基因的 cDNA 用不同颜色的荧光标记,即可检测多个基因表达强度。

1.2 基因表达序列分析(SAGE) 它将基因的转录子标签串联克隆到同一载体上进行连续测序,每一个标签在测序中出现的概率与该基因表达水平成正相关,通过分析对比,即可得到某个细胞或组织的基因表达谱^[5]。Datson 等^[6]在此基础上建立了微 SAGE,不同于 DNA 芯片只能分析已知基因的表达,SAGE 技术可以分析已知和未知基因的表达。

1.3 荧光条形码标记单分子检测技术 在 2008 年,Geiss 等^[7]建立了一种更灵敏的基因表达谱技术。它采用 2 条长度约为 35~50 bp 的探针与待测 mRNA 杂交,指示探针携带的颜色标签供信号检测,不同颜色标记的 RNA 片段的线性顺序就形成了某种基因的密码。捕获探针用于杂交后的复合物固定。此技术最大的优点是根据计算图像显示的颜色顺序就可以直接确定某种目标 mRNA,并得出某个基因转录子的数量。

1.4 实时定量 PCR 实时定量 PCR 是由 Higuchi 建立的。它是指在 PCR 指数扩增期间通过连续监测荧光信号强弱的变化即时测定特异性产物的量,并据此推断目的基因的初始量。实时定量 PCR 是检测低丰度基因表达水平最敏感的技术^[8]。

2 基因表达谱在临床恶性肿瘤中的应用

2.1 分子分型 目前肿瘤的分型依靠人为的病理学分型手段,病理学检查有时难以区分细胞形态相似但分子水平有巨大差异的肿瘤亚型。基因表达谱可以从基因水平提供准确的分型,避免病理医生的个人主观因素干扰。最早将基因表达谱用于疾病分子分型的是 Golub 等^[9],在没有任何临床生物信息的情况下,将急性髓细胞白血病与急性淋巴细胞白血病区分。与此相似的,Cui 等^[10]建立了 3 组基因标签,成功应用于胃癌的病理学分级和分期,准确率分别为 74.2%、90%和 84%。

基因表达谱在乳腺癌分子分型方面做出了巨大的贡献,Perou 等^[11]和 Sorlie 等^[12]的研究团队基于雌二醇受体(ER)表达情况的不同,发现了 ER 阳性和 ER 阴性的乳腺癌是两种在分子水平上完全不同的疾病。据此,研究人员又发现 4 种乳腺癌亚型,即腔上皮型,基底样型,正常乳腺样型和人类表皮生长因子受体 2 阳性型。此种分型现已广泛应用于临床,是医生决定患者治疗方案、判断患者预后的重要指标之一。不仅在普通乳腺癌,基因表达谱也在一些少见恶性肿瘤中取得进展。Ang 等^[13]研究了 21 例不同组织病理分级的乳腺叶状瘤患者,发现随着肿瘤恶性程度的增加,一些与细胞间相互作用,细胞转录和生长相关的基因表达水平逐渐上调。HOXB13 是一种转录调控因子,异位表达的 HOXB13 可致肿瘤的发生和细胞的转化。其在恶性乳腺叶状瘤患者的表达水平高于交界性和良性叶状瘤患者,提示其的高水平表达可能与肿瘤的恶性变有关。

2.2 早期诊断 大多数肿瘤患者在确诊时已经发展至晚期,使得患者的生存年限大大降低。造成这种现象的原因部分是

由于缺乏特异的检测标志物和症状,另外是由于缺乏高效的检测手段。因此,提高对肿瘤早期阶段的生物特征和生物标志物的认识,无论是对患者还是临床研究,都至关重要。胃癌早期症状易与其他疾病混淆,在早期诊断方面缺少有意义的客观指标。郭瑞芳等^[14]建立了胃癌患者胃黏膜及癌旁形态学正常组织的差异表达基因,其中 EGRI、CYR61、ADAMTS1 在正常胃黏膜、肠上皮化生、异型增生和癌变组织中的表达水平逐渐增高。

肺癌患者由于早期临床症状不明显,缺乏特异的标志物,目前只能借助影像学检查。Valk 等^[15]通过对 131 例非小细胞肺癌的基因表达谱研究,发现了一系列新的基因标志物。RNAi 可以介导精液相关抗原 5(SPAG5)的转录后沉默,引起细胞凋亡,在非小细胞肺癌患者癌组织中发现 SPAG5 表达水平上调,这可能是导致肿瘤细胞不断增殖的原因之一。表面活性蛋白 D(SETPD)广泛表达于 2 型肺泡细胞,参与调控炎症反应和吞噬病原体。在非小细胞肺癌患者的癌组织中其表达水平下调,导致了不可控制的炎症反应,这可能是肿瘤早期的标志。Zander 等^[16]通过对肺癌患者外周血单个核细胞的基因表达谱分析,建立了一个具有 484 个基因的筛选谱,并成功地应用其将肺癌 I 期和健康人区分。

2.3 临床预后 转移和侵袭浸润是恶性肿瘤的重要生物表型,是影响恶性肿瘤预后的主要因素。其中,肿瘤内部丰富的血流供应是肿瘤不断扩大增殖和转移的始动因素之一。有学者发现大部分内皮标志物广泛表达于各种类型肿瘤,并且同一基因在不同肿瘤的血管中有相似的表达模式^[17]。其中 6 个基因与新生血管的生成有关,至少 7 个基因编码细胞外基质蛋白的生成和重塑,这些基质相关蛋白的形成是新生血管的重要过程。现已有研究小组对脑肿瘤、结肠癌和皮肤癌进行研究,证实肿瘤组织内存在一小部分细胞驱动肿瘤生长,即肿瘤干细胞(CSC),想要治愈癌症可能需要将这些所谓的肿瘤干细胞清除^[18]。乳腺癌是近年来研究的热点领域。van't Veer 等^[19]通过对 78 名年轻女性乳腺癌患者的 5 000 个基因进行分析,最终确定了一个由 70 个基因组成的预后指数,其对预后的准确率要高于组织病理指标,基于此研究,第一个商品化多基因预后标签-MammaPrint,由美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于临床。与 van't Veer 等^[19]的实验研究的可靠性更适合于雌二醇受体阳性的患者不同,第二代基因预后标签可以应用于雌二醇受体阴性和增生性雌二醇受体阳性的肿瘤患者。它是由一系列激素治疗后相关免疫基因组成^[20]。将第一代和第二代基因预后标签联合应用,可决定患者是否需要激素治疗和需要治疗患者的 5 年转移情况^[21]。

Lu 等^[22]探究了非小细胞肺癌 I 期患者不同基因的表达水平与术后复发的关系,F 框/WD-40 域蛋白 7(FBXW7)是一种肿瘤抑制因子,它可以介导多种癌蛋白的降解从而抑制肿瘤的发生;成纤维细胞生长因子受体 2(FGFR2)是促进胃癌进展的关键分子。低表达的 FBXW7 和高表达的 FGFR2 都可以增加 I 期肺癌患者术后复发的风险。

2.4 治疗反应 生物细胞免疫治疗是治疗肿瘤的较为成熟的手段,它应用多种细胞因子诱导癌细胞凋亡,激活机体免疫系统,提高机体的免疫功能。Zimmerer 等^[23]首次描述了经过一定剂量的 α 干扰素作用后,T 细胞、单核细胞和自然杀伤细胞的基因差异表达谱,他将 6 例治疗前黑色素瘤患者的外周血单个核细胞分离出来,分别对患者和分离出的外周血单个核细胞进行一定剂量的 α 干扰素作用。结果发现,体内试验和体外试验有着相似的差异表达谱,由此证明,体外试验的结果可以用

来预测患者的免疫治疗情况。最近, Arico 等^[24]对 α -干扰素治疗后的黑色素瘤患者体内免疫细胞的基因表达谱进行了更深入的研究, 揭示了 α -干扰素的作用机制, 并发现 CXCL10 不仅在黑素瘤患者, 而且在丙型肝炎患者接受干扰素治疗后表达水平也提高, CXCL10 表达水平的提高是免疫细胞接受干扰素作用后最主要的变化, 它表达于活化的 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、自然杀伤细胞和树突状细胞。可以认为 CXCL10 可预测免疫治疗的最终效果。

3 展 望

基因表达谱分析, 作为一种基因表达高通量的分析技术, 已经取得飞速发展, 尤其是在人类恶性肿瘤的研究中发挥了巨大的优势, 但基因表达谱技术还面临着诸多挑战: (1) 基因表达谱分析对于肿瘤的早期诊断研究非常有限。在肿瘤发生的早期阶段, 部分基因已经发生表达水平的改变, 并且这种改变持续贯穿整个肿瘤发展全过程, 因此, 比较肿瘤患者的癌组织和癌旁形态学正常组织时, 这些基因很难鉴定出来。已有研究指出, 以非癌患者的正常组织做对照, 癌旁形态学正常的组织已经存在明显的差异表达基因^[25]。(2) 由于目前技术的限制, 基因表达谱所产生的海量的数据中只有部分数据可以利用在所得到的有意义的数据中, 如何将这些有意义的数据整合联系在一起, 综合研究肿瘤的发生、发展机制, 仍是广大研究人员面临的难题。

虽然基因表达谱技术存在很多尚未完善的问题, 但是随着生物信息学的发展以及基因功能研究的深入开展, 将基因表达谱技术与其他新兴技术联用, 如 microRNA 芯片^[26]、比较基因组杂交、基因甲基化分析, 单核苷酸多态性检测等, 可以更好的研究肿瘤的细胞遗传学变化, 为研究肿瘤发生、发展机制及治疗预后提供更全面的信息。

参考文献

[1] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008; GLOBOCAN 2008[J]. Int J Cancer, 2010, 127(12):2893-2917.

[2] Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control[J]. Nat Med, 2004, 10(8):789-799.

[3] Heng HH, Stevens JB, Bremer SW, et al. The evolutionary mechanism of cancer[J]. J Cell Biochem, 2010, 109(6):1072-1084.

[4] Schena M, Shalon D, Davis RW, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray[J]. Science, 1995, 270(5235):467-470.

[5] Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, et al. Serial analysis of gene expression[J]. Science, 1995, 270(5235):484-487.

[6] Datson NA, van der Perk-de Jong J, van den Berg MP, et al. MicroSAGE: a modified procedure for serial analysis of gene expression in limited amounts of tissue[J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27(5):1300-1307.

[7] Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B, et al. Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs[J]. Nat Biotechnol, 2008, 26(3):317-325.

[8] Bustin SA, Benes V, Nolan T, et al. Quantitative real-time RT-PCR—a perspective[J]. J Mol Endocrinol, 2005, 34(3):597-601.

[9] 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(5439):531-537.

[10] Cui J, Li F, Wang G, et al. Gene-expression signatures can distin-

guish gastric cancer grades and stages[J]. PLoS One, 2011, 6(3): e17819.

[11] Perou CM, Srlic T, Eisen MB et al. Molecular portraits of human breast tumours[J]. Nature, 2000, 406(6797):747-752.

[12] Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(19):10869-10874.

[13] Ang MK, Ooi AS, Thike AA, et al. Molecular classification of breast phyllodes tumors: validation of the histologic grading scheme and insights into malignant progression[J]. Breast Cancer Res Treat, 2011, 129(2):319-329.

[14] 郭瑞芳, 臧师竹, 房静远, 等. 一组与胃黏膜演化及早期癌变相关基因的鉴定及生物学意义[J]. 北京大学学报: 医学版, 2009, 41(3):353-360.

[15] Valk K, Vooder T, Kolde R, et al. Gene expression profiles of non-small cell lung cancer: survival prediction and new biomarkers[J]. Oncology, 2010, 9(3/4):283-292.

[16] Zander T, Hofmann A, Staratschek-Jox A, et al. Blood-based gene expression signatures in non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(10):3360-3367.

[17] St Croix B, Rago C, Velculescu V, et al. Genes expressed in human tumor endothelium[J]. Science, 2000, 289(5482):1197-1202.

[18] Driessens G, Beck B, Caauwe A, et al. Defining the mode of tumour growth by clonal analysis[J]. Nature, 2012, 488(7412):527-530.

[19] van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer[J]. Nature, 2002, 415(6871):530-536.

[20] Reyat F, van Vliet MH, Armstrong NJ, et al. A comprehensive analysis of prognostic signatures reveals the high predictive capacity of the proliferation, immune response and RNA splicing modules in breast cancer[J]. Breast Cancer Res, 2008, 10(6):R93.

[21] Symmans WF, Hatzis C, Sotiriou C, et al. Genomic index of sensitivity to endocrine therapy for breast cancer[J]. J Clin Oncol, 2010, 28(27):4111-4119.

[22] Lu Y, Wang L, Liu P, et al. Gene-expression signature predicts postoperative recurrence in stage I non-small cell lung cancer patients[J]. PLoS One, 2012, 7(1):e30880.

[23] Zimmerer JM, Lesinski GB, Ruppert AS, et al. Gene expression profiling reveals similarities between the in vitro and in vivo responses of immune effector cells to IFN-alpha[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(18):5900-5906.

[24] Arico E, Castiello L, Urbani F, et al. Concomitant detection of IFN-alpha signature and activated monocyte/dendritic cell precursors in the peripheral blood of IFN-alpha-treated subjects at early times after repeated local cytokine treatments[J]. J Transl Med, 2011, 9(1):67.

[25] Zang S, Guo R, Zhang L, et al. Integration of statistical inference methods and a novel control measure to improve sensitivity and specificity of data analysis in expression profiling studies[J]. J Biomed Inform, 2007, 40(5):552-560.

[26] Munker R, Calin GA. MicroRNA profiling in cancer[J]. Clin Sci (Lond), 2011, 121(4):141-158.