

2012,18(1):BR33-40.

[15] Lam NY, Rainer TH, Chan LY, et al. Time course of early and late changes in plasma DNA in trauma patients[J]. Clin Chem, 2003,49(8):1286-1291.

[16] Campello Yurgel V, Ikuta N, Brondani da Rocha A, et al. Role of plasma DNA as a predictive marker of fatal outcome following severe head injury in males[J]. J Neurotrauma, 2007, 24(7):1172-1181.

[17] Wagner J. Free DNA—new potential analyte in clinical laboratory diagnostics? [J]. Biochem Med(Zagreb), 2012, 22(1):24-38.

[18] Akirav EM, Lebastchi J, Galvan EM, et al. Detection of β cell death in diabetes using differentially methylated circulating DNA [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(47):19018-19023.

[19] Kotsch K, Mashreghi MF, Bold G, et al. Enhanced granulysin mRNA expression in urinary sediment in early and delayed acute renal allograft rejection[J]. Transplantation, 2004, 77(12):1866-1875.

[20] Ding C, Cantor CR. A high-throughput gene expression analysis technique using competitive PCR and matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight MS[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(6):3059-3064.

[21] Ding C, Chiu RW, Lau TK, et al. MS analysis of single-nucleotide differences in circulating nucleic acids: Application to noninvasive prenatal diagnosis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(29):10762-10767.

[22] Ellinger J, Müller DC, Müller SC, et al. Circulating mitochondrial DNA in serum: a universal diagnostic biomarker for patients with urological malignancies[J]. Urol Oncol, 2012, 30(4):509-515.

[23] Huang Z, Hua D, Hu Y, et al. Quantitation of plasma circulating DNA using quantitative PCR for the detection of hepatocellular carcinoma[J]. Pathol Oncol Res, 2012, 18(2):271-276.

(收稿日期:2013-04-17)

• 综 述 •

微阵列比较基因组杂交技术及其在肿瘤拷贝数变化研究中的应用进展*

徐秋月 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 650000)

关键词:微阵列比较基因组杂交技术; 肿瘤; 拷贝数变化
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.18.035 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2013)18-2426-03

肿瘤是一种严重威胁健康和生命的疾病,据统计约有50%的男性和30%的女性可能患病^[1],并且超过半数的肿瘤患者分布在医疗条件欠缺的发展中国家^[2]。肺癌的发生发展是一个多基因参与、多阶段发展的病理过程,而基因组DNA拷贝数变化(CNVs)是引起肿瘤基因异常的重要机制之一,识别特征性CNVs及所含基因对认识肿瘤的将起到重要作用。微阵列比较基因组杂交(aCGH)技术作为一种新型细胞-分子遗传学技术,具有高分辨率、高通量和自动化的特点,使用少量DNA就能检测出不同类型肿瘤在发生发展的不同时期中CNVs变化水平。因此aCGH技术特别适用于研究肿瘤及遗传^[3]等复杂基因组改变的疾病,对于判断患者预后,选择个体化治疗方案具有重要的意义。本文就aCGH的原理、特点和在肿瘤研究中的应用和进展阐述如下。

1 aCGH的原理、分类、方法与技术进展

1.1 aCGH的基本原理和分类 aCGH与比较基因组杂交技术(CGH)的原理相似,使用不同颜色荧光染料如cy5(红色)和cy3(绿色)标记的实验和对照样品的片段化DNA在人类全基因组DNA微阵列芯片上进行竞争性杂交,通过比较两种荧光信号的颜色和相对强弱,便可判断各染色体的CNVs:红绿色均等的区域为肿瘤细胞与正常细胞均具有的正常部分,红色较强的部分是肿瘤细胞染色体区域产生扩增的区域,以绿色为主的部分则是肿瘤细胞染色体缺失的区域。根据微阵列上所固化的核苷酸的性质,可将aCGH芯片分为cDNA aCGH、大插入aCGH、寡核苷酸aCGH这3种类型:cDNA aCGH芯片广泛分布着表达序列标签(EST);大插入aCGH敏感性和信噪比

较高;寡核苷酸aCGH易于标准化,重复性高,在实际操作中可根据不同的研究标准或是肿瘤类型来选择合适的芯片。

1.2 分析方法 aCGH的分析步骤为:(1)数据的预处理:用阴性对照或综合全部非杂交点的平均信号来校正背景噪音,然后使用归一化因子调整数据。目前常用于调整aCGH数据的方法有:看家基因法、总光密度法、回归技术和比率统计归一化。(2)CNVs筛选:使用统计方法筛选肿瘤及对照组存在显著差异的区域;aCGH能鉴定出相似病例的共同断裂点及大小,一般认为共同变异大于10%即有意义;最后结合相关研究结果确定CNVs的最小关键区域,通过生物信息学找出其中包含的基因,筛选出与本研究相关的候选基因。查阅CNVs常用的数据库有:database of genomic variants(<http://projects.tcag.ca/variation/>)与Human Structural Variation Database(<http://humanparalogy.gs.washington.edu/structuralvariation/>);(3)验证:CNVs对表型的调控作用是通过改变候选基因的转录(及推测随后的翻译)水平,因此使用较精确的FISH、RT-PCR或对相关基因的mRNA、蛋白做进一步检测,验证aCGH分析结果也是不可或缺的步骤。

1.3 aCGH的技术进展 经典的CGH技术,不能提供CNVs的精确定量与定位,并且需人工校正核型分析软件的结果。为突破传统CGH的局限性,1997年Solinas-Toldo等^[4]率先在自己的研究中使用了Matrix-CGH,1998年这项技术又得到Pinkel等^[5]研究组的进一步优化,aCGH技术用探针代替中期染色体做为微阵列杂交靶,避开复杂的染色体结构,从而提高分辨率。为了适应不同研究的需要,科学家开发出许多不同种

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81160292)。 作者简介:徐秋月,女,在读硕士研究生,主要从事临床检验诊断专业研究。
[△] 通讯作者,E-mail:duanyong7@139.com。

类的 aCGH 芯片和新的实验方法: (1) 同源小鼠跨物种微阵列比较基因组杂交分析, 可以提供具有高保真度的遗传背景; (2) 限制性 aCGH, 对已知缺失、复制综合征或有明确临床意义的关键区域进行分析, 既提高了分辨率又降低了实验成本, 建立与疾病相关的专用 aCGH, 以增加分析特异性, 如检测线粒体疾病的 MitoMet array; (3) 追踪肿瘤进化树的研究^[6]发现, 肿瘤细胞具有高度遗传异质性, 使用单细胞杂交基因组比较技术 (SCOMP)^[7]或者使用核心析积-畸变区域检测分析法 (C-SMART) 来可以解决样本不均一的问题; (4) 将 aCGH 与其他分子生物学技术联合应用, 将同一标本在 aCGH、表达谱芯片和蛋白免疫印迹分析等多个平台上进行关联性分析, 进一步探索 CNVs 在转录和翻译水平上对肿瘤产生的影响。

2 aCGH 在肿瘤中的应用

目前, aCGH 已成为研究肿瘤 CNVs 的常用方法, 既可以用全基因组芯片对受检者所有基因进行全面筛查, 也可以根据临床指征或特定肿瘤的特点和现有的生物学信息, 选取特定区段进行精细分析, 识别特征性的 CNVs 并为 CNVs 所含基因提供精确定位, 为肿瘤的分子诊断和预后提供依据, 并为肿瘤发生发展和耐药分子机制的研究提供帮助。

2.1 肿瘤的诊断和分类 经典肿瘤分类、诊断的方法建立在形态学的基础上, 但有些肿瘤在镜下的形态难以分辨, 加之免疫组化方法有限, 很难为临床提供快速而准确的诊断依据。CNVs 具有疾病特异性的特点, 因此 aCGH 可作为常规检测之前或检测失败之后的早期辅助诊断方法。研究表明 aCGH 可以筛查出形态学方法难以诊断的 MDS^[8]、霍奇金淋巴瘤^[9]、骨肿瘤^[10]、炎性乳癌^[11]与乳腺癌^[12]等疾病的特征性 CNVs, 这些生物标志物可以为不同类型的癌性病变提供快速分子学鉴别诊断。

肿瘤亚型的分类不但能够影响患者预后, 对临床医生选择诊治方案也起到决定性作用, 而 aCGH 分析数据可作为肿瘤亚型的分类依据: 良性滤泡腺瘤、乳头状甲状腺癌与滤泡型甲状腺癌是术前细胞学检查中最常见不确定的三个亚型, Liu 等^[13]确定了位于 12 号染色体上的 5 个基因做为这三种甲状腺癌分类的标志, 分型正确率可达 90%, 为患者手术方案的选择提供了有力的保障。根据特征性的 CNVs, aCGH 技术还有利于发现新的肿瘤亚型, Martinez 等^[14]发现在长期石棉暴露的肺鳞癌患者中 1q21.1, 7p22.3, 9q12 和 19q13.31 有显著缺失, 另外扩增的 19q13.33 片段上也包含了已知致癌基因, 因此将这种与吸烟无关、石棉暴露相关的肿瘤诊断为一个新的肺鳞癌亚型。随着技术的进步, 特别是 aCGH 与测序技术结合应用, 将识别更多罕见肿瘤的基因改变, 对肿瘤的诊断、分类和细胞遗传学研究起到极为重要的作用。

2.2 肿瘤预后分析 目前用于肿瘤风险评估的常规方法包括 TNM 分期、肿瘤标志物和病理 Gleason 评分 (GS), 然而肿瘤的临床分期和病理分级都有较大的主观性, 为患者分析预后的能力有限。Zafarana 等^[15]研究发现用常规方法评价出在前列腺癌相同风险组的患者中, 约有 20%~40% 的患者在经局部图像引导放射治疗后失败, 然而通过 aCGH 检测发现这些患者的肿瘤细胞基因中存在显著的 10q-PTEN 缺失和 8q-c-MYC 扩增; Sriram 等^[16]研究表明位于 18q22.3 的 SOCS6 基因拷贝数低表达是肺鳞癌复发的独立危险因素, 而在肺内神经内分泌肿瘤中存在 11q22.3-q25 的缺失的患者预后较差^[17], 因此可以将特征性 CNVs 作为评价患者治疗反应和预后的分子学指标。

肿瘤的转移和侵袭是影响癌症患者预后最重要的因素之一, 目前诊断淋巴结转移的“金标准”是病理组织学检查, 然而

它会受到淋巴清扫范围、取材方法与淋巴结微转移的影响。aCGH 研究结果可以客观的预测患者是否会发生淋巴结转移: Wang 等^[18]比较了存在前哨淋巴结转移、远端淋巴结转移和无淋巴结转移的原发性乳腺浸润性导管癌 (IDCs), 将 17q24.1-24.2 的显著扩增作为淋巴结转移风险增加的标志。Chen 等^[19]通过 aCGH 将 20q11.21-q13.33, 13q11-34, 7p22.3-p22.2 和 8q23.3-q24.3 的扩增与 18q11.32-q23, 17p13.3-q11.1, 10q23.1 和 4q32.1-q32.3 的缺失作为晚期直肠癌患者放疗后淋巴结转移的生物指标, 使用这个模型预测淋巴结转移的正确率为 86%, 高于另一个将肿瘤大小、梗阻情况等临床资料做为预测模型的准确率^[20]。因此 CNVs 对于制定个性化治疗意义重大, 为临床手术方案的制定提供一定的参考依据。

2.3 肿瘤耐药机制研究 研究表明耐药肿瘤细胞的发展和富集导致了肿瘤转移和患者的最终死亡, 因此识别耐药肿瘤细胞的特征性 CNVs 有助于肿瘤耐药机制的研究。Gamazon 等^[21]以微阵列和测序为基础, 分析肿瘤细胞对铂酸盐敏感和拓扑异构酶 II 耐药的机制; Hjortland 等^[22]将胃食管腺癌患者骨髓骨髓中上皮特异抗体阳性的 14 个癌细胞中通过 aCGH 分析, 发现了扩增的 KRAS (12p12.1) 和 ERBB2 (HER2/NEU) (17q12-q21.2) 基因可能与耐药相关; Heffeter 等^[23]建立了一个联合 aCGH 与 FISH 技术的细胞模型, 探索 Triapine 在实体瘤中的耐药机制。对少量细胞进行药物基因组学和 SNP 分析集成的 CNVs 整体分析, 还可以识别潜在的药物治疗靶点: Voortman 等^[24]通过分析肺小细胞癌 AKT-mTOR 细胞凋亡途径, 发现了肺神经内分泌肿瘤中潜在的药物靶标, 表明了药物基因组学和 CNVs 在定制个性化癌症治疗方案中的重要性和可行性。

2.4 探索肿瘤发病机制 CNVs 对与肿瘤发病相关的基因起筛选作用, 染色体扩增的区域提示可能存有潜在癌基因, 丢失区域则可能存有潜在的抑癌基因。在肾上腺皮质腺瘤中^[25]分析得出, 早期肿瘤的发生与 5p15.33, 6q16.1, 7p22.3-22.2, 8q24.3, 9q34.2-34.3, 11p15.5, 11q11, 12q12, 16q24.3, 20p11.1-20q21.11 和 Xq28 的扩增有关, 说明这些区域中可能含有原癌基因。Carracedo 等^[26]对 ER+ (雌激素受体) PR- (孕激素受体) 型和 ER+ PR+ 型乳腺癌的 CNVs 分析后发现它们在 17q23.2-q23.3, 20q13.12 的扩增与 3p21.32-p12.3, 9pter-p13.2, 17pter-p12, 21pter-q21.1 的缺失存在显著差异; 缺失区域包含的抑癌基因涉及到细胞凋亡、有丝分裂、血管生成和细胞扩散, 扩增区域包括了 MAP3K3, RPS6KB1 和 ZNF217 基因, 它们可以增强肿瘤细胞对细胞凋亡的抵抗并激活 PI3K/Akt/mTOR 凋亡途径, 这个研究从基因水平上阐述了肿瘤亚型具有不同恶性程度的发病机制。最近的研究^[27]将 SNP 数据与 aCGH 芯片相结合, 建立了肿瘤候选基因与未知基因的共同表达网络, 用于分析 CNVs 在肿瘤进展中的作用, 为肿瘤发病机制和基因功能研究提供了新的方向。

3 小 结

虽然微阵列实验能快速有效地检测出基因组改变的区域, 但实验数据的复杂性和特异性使得后续分析比较困难, 实验技术也存在一定的局限性: (1) aCGH 的分辨率和覆盖面依赖于探针的数量和密度, 而探针越多产生的未知 CNVs 也越多, 用于质控、制造和鉴定的费用也更加昂贵; (2) 构建 aCGH 平台仍需要一些特殊设备和专业操作人员; (3) aCGH 是一个封闭的系统, 不能检测到探针没有覆盖到的信息, 即有盲区; (4) CNVs 数据并不是基因的实际变化水平, 也没有标准化的参考样本, 并且常作为实验对照组的癌旁组织或外周血单核细胞 (PBMC) 中也存在不同程度的变异, 因此想要进行不同实验室

间数据的对比非常困难;(5)aCGH 尚不能检测出平衡性的基因组易位及倒位,对不同疾病 CNVs 的检出率也不相同;(6)大多数 CNVs 都没有与疾病表型建立联系,需等待进一步的研究。要使 aCGH 得到更广泛的运用,应改进以下方面:(1)开发具有更高分辨率并且更低成本的阵列,完善基因诊断流程,提供自动化的断裂点计算和统计分析;(2)建立规范化的 CNVs 数据库;(3)现在肿瘤研究方向为单个细胞的检测,因此应提高微量样本 aCGH 检测结果的可靠性和重复性。

aCGH 技术发展至今 15 年来,在全球科学家的不断探索下发现了越来越多的肿瘤候选基因,为阐明肿瘤的发生发展和耐药机制提供了依据。相信在不远的将来,随着 aCGH 芯片技术的不断完善并与人类基因组序列信息结合起来,将作为常规核型分析技术为临床医师提供更多帮助,并为基因诊断和个性化医疗健康管理开辟新的前景。

参考文献

- [1] Siegel R, DeSantis C, Virgo K, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(4): 220-241.
- [2] 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.
- [3] 张艳亮,涂植光,戴勇.微阵列比较基因组杂交技术及其在遗传性疾病中的应用[J].中华检验医学杂志,2009,32(10):1188-1190.
- [4] Solinas-Toldo S, Lampel S, Stiglbauer S, et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances[J]. Genes Chromosomes Cancer, 1997, 20(4): 399-407.
- [5] Pinkel D, Segraves R, Sudar D, et al. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays[J]. Nat Genet, 1998, 20(2): 207-211.
- [6] Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing[J]. N Engl J Med, 2012, 366(10): 883-892.
- [7] Uda A, Tanabayashi K, Fujita O, et al. Comparison of whole genome amplification methods for detecting pathogenic bacterial genomic DNA using microarray[J]. Jpn J Infect Dis, 2007, 60(6): 355-361.
- [8] Vercauteren SM, Sung S, Starczynowski DT, et al. Array comparative genomic hybridization of peripheral blood granulocytes of patients with myelodysplastic syndrome detects karyotypic abnormalities[J]. Am J Clin Pathol, 2010, 134(1): 119-126.
- [9] Slovak ML, Bedell V, Hsu YH, et al. Molecular karyotypes of Hodgkin and Reed-Sternberg cells at disease onset reveal distinct copy number alterations in chemosensitive versus refractory Hodgkin lymphoma[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17(10): 3443-3454.
- [10] Szuhai K, Cleton-Jansen AM, Hogendoorn PC, et al. Molecular pathology and its diagnostic use in bone tumors[J]. Cancer Genet, 2012, 205(5): 193-204.
- [11] Bekhouche I, Finetti P, Adelaide J, et al. High-resolution comparative genomic hybridization of inflammatory breast cancer and identification of candidate genes[J]. PLoS One, 2011, 6(2): e16950.
- [12] Long J, Delahanty RJ, Li G, et al. A common deletion in the APO-BEC3 genes and breast cancer risk[J]. J Natl Cancer Inst, 2013, 105(8): 573-579.
- [13] Liu Y, Cope L, Sun W, et al. DNA copy number variations characterize benign and malignant thyroid tumors[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2013, 98(3): E558-566.
- [14] Martinez VD, Buys TP, Adonis M, et al. Arsenic-related DNA copy-number alterations in lung squamous cell carcinomas[J]. Br J Cancer, 2010, 103(8): 1277-1283.
- [15] Zafarana G, Ishkanian AS, Malloff CA, et al. Copy number alterations of c-MYC and PTEN are prognostic factors for relapse after prostate cancer radiotherapy[J]. Cancer, 2012, 118(16): 4053-4062.
- [16] Sriram KB, Larsen JE, Savarimuthu Francis SM, et al. Array-comparative genomic hybridization reveals loss of SOCS6 is associated with poor prognosis in primary lung squamous cell carcinoma[J]. PLoS One, 2012, 7(2): e30398.
- [17] Swarts DR, Claessen SM, Jonkers YM, et al. Deletions of 11q22.3-q25 are associated with atypical lung carcinoids and poor clinical outcome[J]. Am J Pathol, 2011, 179(3): 1129-1137.
- [18] Wang C, Iakovlev VV, Wong V, et al. Genomic alterations in primary breast cancers compared with their sentinel and more distal lymph node metastases: an aCGH study[J]. Genes Chromosomes Cancer, 2009, 48(12): 1091-1101.
- [19] Chen Z, Liu Z, Deng X, et al. Chromosomal copy number alterations are associated with persistent lymph node metastasis after chemoradiation in locally advanced rectal cancer[J]. Dis Colon Rectum, 2012, 55(6): 677-685.
- [20] 李力人, 万德森, 潘志忠, 等. 大肠癌淋巴结转移预测模型的建立[J]. 中国肿瘤, 2006, 15(12): 876-878.
- [21] Gamazon ER, Huang RS, Dolan ME, et al. Copy number polymorphisms and anticancer pharmacogenomics[J]. Genome Biol, 2011, 12(5): R46.
- [22] Hjortland GO, Meza-Zepeda LA, Beiske K, et al. Genome wide single cell analysis of chemotherapy resistant metastatic cells in a case of gastroesophageal adenocarcinoma[J]. BMC Cancer, 2011, 11(1): 455.
- [23] Heffeter P, Pirker C, Kowol CR, et al. Impact of terminal dimethylation on the resistance profile of alpha-N-heterocyclic thiosemicarbazones[J]. Biochem Pharmacol, 2012, 83(12): 1623-1633.
- [24] Voortman J, Lee JH, Killian JK, et al. Array comparative genomic hybridization-based characterization of genetic alterations in pulmonary neuroendocrine tumors[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010, 107(29): 13040-13045.
- [25] Ronchi CL, Leich E, Sbiera S, et al. Single nucleotide polymorphism microarray analysis in cortisol-secreting adrenocortical adenomas identifies new candidate genes and pathways[J]. Neoplasia, 2012, 14(3): 206-218.
- [26] Carracedo A, Salido M, Corominas JM, et al. Are ER+PR+ and ER+PR- breast tumors genetically different? A CGH array study[J]. Cancer Genet, 2012, 205(4): 138-146.
- [27] Xu Y, Duanmu H, Chang Z, et al. The application of gene co-expression network reconstruction based on CNVs and gene expression microarray data in breast cancer[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(2): 1627-1637.

(收稿日期: 2013-04-15)