

· 综 述 ·

高通量技术在肿瘤临床检测中的应用

陈文学^{1,2}综述,张焜和²审校

(1. 江西省肿瘤医院检验科,南昌 330029;2. 南昌大学第一附属医院消化内科,南昌 330006)

关键词:高通量技术;肿瘤;芯片技术;蛋白质组学技术

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.12.032

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)12-1226-03

肿瘤因高发病率,高病死率而成为严重威胁人类健康的一种恶性疾病。肿瘤发生是多因素诱导,多阶段逐步发生的,目前传统方法不能有效的评估肿瘤对化疗药物的反应性,肿瘤的复发及预后。高通量技术的出现将给肿瘤的临床检测带来新的契机。

高通量技术是指快速检测大量样本的一类技术,它们的共同特点是速度快、检测样本多、敏感性高、信息量大、可自动化。高通量技术在不同研究领域有其代表性技术,如基因组水平的DNA微阵列(DNA microarray),转录水平的cDNA微阵列(cDNA microarray),蛋白质组水平的双向电泳(two dimensional poly-acrylamide gel electrophoresis, 2D-PAGE),蛋白质质谱分析(mass spectrometry, MS),这些高通量技术在肿瘤检测中应用,将能更快速、全面的了解肿瘤的基因、蛋白水平变化的全貌,有利于对肿瘤进行更准确的诊断、治疗、复发及预后的预测。本文主要综述高通量技术中的芯片技术和蛋白质组学技术在肿瘤临床检测中的应用进展。

1 微阵列技术

20世纪90年代提出了微阵列或芯片的概念,当时的芯片是将cDNA文库点在一张大膜上,用放射性同位素标记基因来显示杂交信号,所以将早期的芯片称为“大芯片”,它只能检测几百种转录本的信号强度。经过十几年的发展,现在芯片技术已经成为一种广泛应用的检测基因表达的工具。

1.1 微阵列技术在肿瘤诊断中的应用 临床上广泛应用的肿瘤标志物都不是肿瘤特异性的,有些标志物在多种肿瘤中表达。肿瘤发生的早期伴随多种基因的变化,通过检测肿瘤特异性的基因改变可以实现肿瘤早期诊断。Yano等^[1]通过cDNA微阵列检测甲状腺癌、正常甲状腺、良性甲状腺疾病中3968候选基因,发现细胞周期调控基因家族、癌基因家族、生长因子家族、生长因子受体家族和磷酸酯酶家族基因在甲状腺癌中的表达明显高于正常甲状腺和良性甲状腺疾病,因此认为cDNA微阵列可以明确的诊断甲状腺癌。一个多中心研究数据显示芯片能够有效的对恶性血液病进行分级,在回顾性研究部分对2143个样本进行全基因组表达分析,结果分级的准确性为92.2%,特异性为99.7%,在前瞻性研究中对1152例患者进行急性白血病14个标准亚型分级(8个急性淋巴性白血病,6个急性髓性白血病分级),分级的敏感性达到95.6%,特异性达到99.8%,因此认为微阵列技术对恶性血液病的诊断明显优于传统的诊断方法^[2]。

DNA甲基化紊乱可以导致基因表达异常及基因组稳定性降低,继而促进肿瘤的发生和发展。Bibikova等^[3]检测了各种组织类型肺癌细胞系、原发性肺腺癌和肺良性疾病组织标本的357个肿瘤相关基因1536个CpG甲基化位点,其中8个基因的甲基化在不同组织中有显著的差异,55个CpG甲基化位点可以区分肺癌与肺良性疾病。Christensen等^[4]分析了988例

标本(肺腺癌57例,肺间皮瘤158例,肺良性疾病773例)1413个肿瘤相关基因的CpG甲基化位点,发现肺腺癌、肺间皮瘤、肺良性疾病甲基化模式完全不同,通过肿瘤相关基因CpG甲基化水平可区分肺腺癌、肺间皮瘤、肺良性疾病。

MicroRNAs也叫非编码RNA(non-coding RNA or ncRNA),在肿瘤的发生发展中起了非常重要的作用。Troels^[5]研究显示在检测的319个MicroRNAs中有25个MicroRNAs在正常黏膜与微卫星不稳定肠癌标本中表达有差异,54个MicroRNAs在正常黏膜与微卫星稳定肠癌标本中表达有差异,因此不同的肿瘤亚型有不同的MicroRNAs表达谱,通过MicroRNAs表达谱可以准确地区分大肠癌的不同亚型。Marilena等^[6]通过MicroRNAs基因组全貌分析发现了15个乳腺癌特异性的MicroRNAs,这些MicroRNAs预测分析样本的特性(肿瘤或正常)的准确性达到100%。

1.2 微阵列技术在肿瘤个体化治疗中的应用 肿瘤患者对化疗药物的反应性是肿瘤治疗的关键。不同的肿瘤患者除了具有相同的病理改变外还有其自身独特的病理发展过程,肿瘤本身的异质性导致不同患者对治疗的反应性不同,以上两个原因是导致部分患者传统化疗失败和治疗后高复发率,因此肿瘤个体化治疗已经成为未来肿瘤治疗的发展方向。

近年来基因芯片技术能有效预测化疗前肿瘤患者对化疗药物的反应性,这些研究涵盖多种肿瘤:弥漫性B细胞淋巴、儿童急性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、儿童骨肉瘤、乳腺癌、肺癌等^[7-17]。Dressman等^[18]通过1727个基因预测浆液性卵巢癌对铂类的敏感性,预测的准确性为84.3%(70/84),特异性85%,敏感性83%,追加36例随机卵巢癌病例验证预测卵巢癌铂类敏感的有效性,准确率达到78%。Tan等^[19]报道开放性多中心II期临床试验评价生物标志物预测厄洛替尼治疗复发性非小细胞肺癌的有效性,来自26个中心264个非小细胞肺癌患者进入研究,所有患者均经过1次或多次化疗失败后使用厄洛替尼治疗,化疗前58例,经过1个疗程化疗134例,2个疗程以上化疗68例,化疗情况未知4例,通过U133基因芯片检测发现7号染色体上3个基因EGFR、PSPH、RAPGEF5高表达,通过qRT-PCR验证及与临床治疗效果相关性分析显示EGFR高表达患者厄洛替尼治疗有效。

1.3 微阵列技术在肿瘤预后中的应用 不同临床分期、病理分级,不同组织来源的肿瘤预后有很大差别。DNA微阵列技术能够更准确地进行肿瘤分子分级和预后判断。Zhu等^[20]对62例早期非小细胞肺癌患者进行mRNA表达谱分析,发现了15个基因可以将手术后患者分为高危险组和低危险组,两组的存活率有显著性差异,同时还发现15个基因的预测模式可以提高高危组患者经过新辅助化疗后的存活率。Schetter等^[21]研究了180例肠腺癌microRNA谱,发现5种microRNA

在肠腺癌中具有高表达,可能与预后有关,进一步研究证实 miR-21 高表达肠腺癌预后差有关,是一个独立的预后因素。

1.4 微阵列芯片平台 微阵列技术已经非常成熟,已经有商品化的微阵列临床检测试剂盒出售。以下是 5 个主要的微阵列生产平台:(1) Affymetrix (Santa Clara, CA) (<http://www.affymetrix.com/>); (2) Agilent Technologies (Palo Alto, CA) (<http://www.chem.agilent.com/>); (3) CodeLink (tm), GE Healthcare (Little Chalfont, Buckinghamshire, United Kingdom) (http://www4.amershambiosciences.com/APTRIX/upp01077.nsf/Content/codelink_bioarray_system); (4) Illumina, Inc. (San Diego, CA) (<http://www.illumina.com/>); (5) NimbleGen Systems Inc. (Madison, WI) (<http://www.nimblegen.com/>)。Affymetrix 和 NimbleGen Systems 公司是生产在芯片上原位合成寡核苷酸为主的芯片。Illumina 公司提供 BeadArray(tm) 平台技术, Agilent 和 CodeLink 公司提供玻璃膜芯片。

2 蛋白质组学技术

基因的突变和异常表达可以导致肿瘤的发生,在基因正常表达的情况下,蛋白转录后调节如:甲基化降低导致蛋白质过度表达,翻译后修饰及蛋白质的糖基化等与肿瘤的发生密切相关,因此蛋白翻译后调节对肿瘤研究非常重要。高通量蛋白质组学技术的出现可以检测肿瘤蛋白质组全貌,为肿瘤的诊断、治疗、预后判断提供有效手段。目前应用的高通量蛋白质组学技术为 2-DE 技术、质谱技术。

2.1 2-DE 电泳技术在肿瘤检测中的应用 Qingyi 等^[22] 分析了 11 例高分化前列腺内皮瘤和 15 例前列腺癌血清标本蛋白质谱,发现色素上皮衍生因子在前列腺癌中均呈极低表达,11 例高分化前列腺内皮瘤中有 6 例低表达,对这 6 例患者随访 10 个月,有 2 例进展为前列腺癌,因此推测色素上皮衍生因子是高分化前列腺内皮瘤进展为前列腺癌预测因子。Zhao 等^[23] 分析了 12 例正常组织与 12 例肠癌组织蛋白质全貌,有 22 种蛋白在肠癌和正常组织间差异有统计学意义,通过时间飞行质谱鉴定其中一种蛋白(N9 点)为转凝蛋白,通过对 126 例临床患者的观察发现转凝蛋白阴性患者(79 例)平均存活时间 55.5 个月,转凝蛋白阳性患者(47 例)平均存活时间为 72.5 个月,通过单因素与多因素分析均证实转凝蛋白是肠癌的一个独立预后因子。

2.2 质谱技术在肿瘤检测中的应用 随着电喷射技术和激光吸附解离技术的引入,质谱技术已经成为肿瘤标志物发现及检测的主要技术之一。Grubb 等^[24] 通过蛋白芯片分析前列腺癌细胞与相匹配的胶质细胞的蛋白表达差异,发现凋亡相关蛋白 Bax 和 Smac/Diablo 高表达, Bcl2 磷酸化增加,原发性前列腺癌与转移性前列腺癌比较发现转移性前列腺癌肿与转移相关的信号通路明显被激活,因此蛋白芯片技术是一种很好的预测肿瘤发生与转移的检测工具。Jou 等^[25] 分析口腔癌与健康者的唾液蛋白质组学,发现转铁蛋白在两者间有显著差异,唾液转铁蛋白水平与口腔鳞癌的大小及分期显著相关。Du 等^[26] 对 30 例小细胞肺癌和 34 例健康者做血清时间飞行质谱分析,发现了 5 中血清标志物可以诊断非小细胞肺癌,诊断的敏感性为 90%,特异性为 97.73%,因此液态芯片时间飞行质谱是一种高效寻找小细胞肺癌肿瘤标志物的方法。

综上所述,尽管肿瘤发生的多因素、多步骤、多阶段特点导致了肿瘤发生和发展相关标志物出现复杂性变化,基因芯片技术与蛋白质组学技术有机结合将在未来的肿瘤检测中有更广阔

的发展空间。

参考文献:

- [1] Yano Y, Uematsu N, Yashiro T, et al. Gene expression profiling identifies platelet-derived growth factor as a diagnostic molecular marker for papillary thyroid carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(6):2035-2043.
- [2] Haferlach T, Kohlmann A, Wiczorek L, et al. Clinical utility of microarray-based gene expression profiling in the diagnosis and subclassification of leukemia; report from the international microarray innovations in leukemia study group [J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(15):2529-2537.
- [3] Bibikova M, Lin Z, Zhou L, et al. High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays [J]. *Genome Research*, 2006, 16(3):383-393.
- [4] Christensen BC, Marsit CJ, Houseman EA, et al. Differentiation of lung adenocarcinoma, pleural mesothelioma, and nonmalignant pulmonary tissues using DNA methylation profiles [J]. *Cancer Research*, 2009, 69(5):6315-6321.
- [5] Troels S, Jrgen TR, Marie SO, et al. Diagnostic and prognostic microRNAs in stage II colon cancer [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(15):6416-6424.
- [6] Marilena VI, Manuela F, Chang-Gong L, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(16):7065-7070.
- [7] Minna JD, Girard L, Xie Y. Tumor mRNA expression profiles predict responses to chemotherapy [J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(28):4329-4336.
- [8] Kawano R, Karube K, Kikuchi M, et al. Oncogene associated cDNA microarray analysis shows PRAME gene expression is a marker for response to anthracycline containing chemotherapy in patients with diffuse large B-cell lymphoma [J]. *J Clin Exp Hematol*, 2009, 49(1):1-7.
- [9] Shalpour S, Hof J, Kirschner-Schwabe R, et al. High VLA-4 expression is associated with adverse outcome and distinct gene expression changes in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia at first relapse [J]. *Haematologica*, 2011, 96(11):1627-1635.
- [10] Lambrou GI, Vlahopoulos S, Papathanasiou C, et al. Prednisolone exerts late mitogenic and biphasic effects on resistant acute lymphoblastic leukemia cells; relation to early gene expression [J]. *Leuk Res*, 2009, 33(12):1684-1695.
- [11] Khanim FL, Bradbury CA, Arrazi J, et al. Elevated FOSB expression; a potential marker of valproate sensitivity in AML [J]. *Br J Haematol*, 2009, 144(3):332-341.
- [12] Burguillo FJ, Martin J, Barrera I, et al. Meta-analysis of microarray data: the case of imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia [J]. *Comput Biol Chem*, 2010, 34(3):184-192.
- [13] Osborne TS, Ren L, Healey JH, et al. Evaluation of eIF4E expression in an osteosarcoma-specific tissue microarray [J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2011, 33(7):524-528.
- [14] Windsor RE, Strauss SJ, Kallis C, et al. Germline genetic

polymorphisms may influence chemotherapy response and disease outcome in osteosarcoma: A pilot study[J]. *Cancer*, 2012, 118(7):1856-1867.

- [15] Kao KJ, Chang KM, Hsu HC, et al. Correlation of microarray-based breast cancer molecular subtypes and clinical outcomes; implications for treatment optimization [J]. *BMC Cancer*, 2011, 11:143.
- [16] Gao W, Lu X, Liu L, et al. MiRNA-21: a biomarker predictive for platinum-based adjuvant chemotherapy response in patients with non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13(6):330-340.
- [17] Guo L, Liu Y, Bai Y, et al. Gene expression profiling of drug-resistant small cell lung cancer cells by combining microRNA and cDNA expression analysis [J]. *Eur J Cancer*, 2010, 46(9):1692-1702.
- [18] Dressman HK, Berchuck A, Chan G, et al. An integrated genomic-based approach to individualized treatment of patients with advanced-stage ovarian cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(5):517-525.
- [19] Tan EH, Ramlau R, Pluzanska A, et al. A multicentre phase II gene expression profiling study of putative relationships between tumour biomarkers and clinical response with erlotinib in non-small-cell lung cancer [J]. *Ann Oncol*, 2010, 21(2):217-222.
- [20] Zhu CQ, Ding K, Strumpf D, et al. Prognostic and predictive gene signature for adjuvant chemotherapy in resected

non-small-cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(29):4417-4424.

- [21] Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, et al. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma [J]. *JAMA*, 2008, 299(4):425-436.
- [22] Qingyi Z, Lin Y, Junhong W, et al. Unfavorable prognostic value of human PEDF decreased in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia: a differential proteomics approach [J]. *Cancer Invest*, 2009, 27(7):794-801.
- [23] Zhao L, Wang H, Deng YJ, et al. Transgelin as a suppressor is associated with poor prognosis in colorectal carcinoma patients [J]. *Mod Pathol*, 2009, 22(6):786-796.
- [24] Grubb RL, Deng J, Pinto PA, et al. Pathway biomarker profiling of localized and metastatic human prostate cancer reveal metastatic and prognostic signatures [J]. *J Proteome Res*, 2009, 8(6):3044-3054.
- [25] Jou YJ, Lin CD, Lai CH, et al. Proteomic identification of salivary transferrin as a biomarker for early detection of oral cancer [J]. *Anal Chim Acta*, 2010, 681(2):41-48.
- [26] Du J, Yang S, Lin X, et al. Use of anchorchip-time-of-flight spectrometry technology to screen tumor biomarker proteins in serum for small cell lung cancer [J]. *Diagn Pathol*, 2010, 5:60-61.

(收稿日期:2011-12-03 修回日期:2012-01-03)

· 综 述 ·

褪黑素及其受体与糖尿病关系的研究进展

汪 娅 综述, 吴红艳 审校

(长江大学附属第一医院内分泌科一病区, 湖北荆州 434000)

关键词:褪黑素;受体;褪黑素;糖尿病

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.12.033

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)12-1228-04

褪黑素是松果体腺分泌的一种吲哚类激素,它作为季节和昼夜节律的调节剂得名,其合成主要在松果体腺细胞内进行,其次位于视网膜,胃肠道和胰腺的神经内分泌细胞及许多非内分泌细胞如免疫细胞也可产生褪黑素^[1-2]。褪黑素具有广泛的生理和药理作用,对生物的昼夜节律、性成熟及生殖、免疫反应、肿瘤、衰老等均有调节作用^[3-5]。褪黑素受体 1A(melatonin receptor-1A, MTNR1A)及褪黑素受体 1B(melatonin receptor-1B, MTNR1B)均为 G 蛋白偶联受体并表达于胰腺 β 细胞中,分别与抑制性 G 蛋白(Gi)相偶联,共同介导 3 个平行的信号通路从而对胰岛素的分泌及 β 细胞功能产生不同的影响。MTNR1B 基因的变异可显著升高空腹血糖水平、降低 β 细胞分泌功能,同时可增加远期 2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)的风险。基于褪黑素、MTNR 与胰岛素分泌、空腹血糖水平及 β 细胞分泌功能之间紧密的相关性,本文对近年来褪黑素及其受体与糖尿病(DM)关系的研究进展作一综述。

1 褪黑素的合成和分泌

褪黑素的合成以色胺酸为原料,经羟化、脱羧及 N-乙酰转移酶等的催化,最终形成褪黑素,其中血清素-N-乙酰转移酶对

褪黑素的乙酰化是其生物合成的限速步骤。在大多数物种中,褪黑素的合成及其随后的分泌受血清素-N-乙酰转移酶活性的调节。其具体过程为:光线激活视网膜的光感受器以控制下丘脑视交叉上核的昼夜节律钟。在夜间,去甲肾上腺素自颈上神经节到松果体的传入冲动增加,激活 β_1 -肾上腺素能受体与兴奋性 G 蛋白相偶连,导致了腺苷酸环化酶的活化,随后细胞内环单磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)水平增加,蛋白激酶 A 激活。最终导致了泛素蛋白酶体系受到抑制,从而血清素-N-乙酰转移酶的降解减少,而血清素-N-乙酰转移酶是催化合成褪黑素的限速步骤,因此最终褪黑素的合成增加^[6]。此外,蛋白激酶 A 磷酸化并激活 cAMP 反应元件结合蛋白,可激活编码血清素-N-乙酰转移酶基因的转录。血清素-N-乙酰转移酶蛋白自身也可以被蛋白激酶 A 磷酸化及活化。尽管这些过程在不同物种中有所不同,但血清素-N-乙酰转移酶的活化均可提高褪黑素的合成和释放率,此限速步骤至关重要。

这个过程解释了夜间松果体血清素-N-乙酰转移酶 mRNA 水平相对白天有大约 100 倍增多的原因^[7]。因此,生理状