

生物芯片在肺癌研究中的应用

林嘉颖综述, 吴一龙审校

关键词: 生物芯片; 肺肿瘤; 基因芯片; 基因表达

中图分类号: R734.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2004)08-0514-04

0 引言

肺癌是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一, 目前, 肺癌的研究焦点主要集中于揭示肺癌的发病机制, 探讨更好的诊断和治疗方法。然而, 传统建立在电泳基础上的基因表达、序列测定、突变和多态性检测等研究方法, 如 PCR 法、mRNA 差异显示、Northern blotting、western blotting 等, 由于费时、费力、信息量少且不利于自动化, 在一定程度上限制了肺癌的深入研究。科学家们迫切需要一种新的方法, 能以大规模、高通量的方式研究成千上万个基因在各种生理、病理状态下的表达, 预测基因的功能, 阐明基因间的相互作用和调控网络。生物芯片就是这种背景下诞生的。它的出现是分子生物技术的重大突破, 结合了人类基因组计划提供的大量信息的生物芯片, 使我们能够在全部基因组水平上进行研究, 其精细度可达到单个细胞中的一个拷贝。生物芯片不仅使我们从了解单个相关基因走向探讨多个基因构成的表达模式, 而且使我们可从核酸、基因、蛋白所构成的复杂系统着眼进行研究, 大大扩大了研究的深度和广度。目前生物芯片主要包括基因芯片、组织芯片、蛋白芯片等, 其中以基因芯片研究最多。

1 基因表达谱的研究

肺癌主要分为两大类, 一类是非小细胞肺癌, 包括肺鳞癌、肺腺癌、大细胞肺癌等, 约占 80%; 另一类是小细胞肺癌, 约占 20%。肺癌基因表达谱的差异隐含了肺癌在发生发展过程中, 增殖周期中不同的阶段, 不同的病理分期, 不同的生物学行为以及在不同的诱导环境下的分子基础, 为我们进一步研究肺癌的发生机制, 指导诊断与治疗提供重要的线索。

Cojocara 等^[1] 利用寡核苷酸芯片对 12 例非小细胞肺癌组织, 6 例正常的癌旁组织和 5 例正常肺组织的混合 RNA 进行了基因表达的检测, 结果显示肿瘤组织与正常组织的表达谱显著差异, 通过数据分析, 发现了许多与肺癌发生发展密切相关的基

因, 这些基因功能的深入研究有可能为我们提供新的药靶和敏感的肿瘤标记物。

此外, 有学者分别对肺鳞癌、肺腺癌、细支气管肺泡癌等进行了更详细的研究。如 Wang 等^[2] 利用 CDNA 削减杂交和 CDNA 微阵列相结合的方法来鉴定肺鳞状细胞癌中差异表达基因, 结果发现 17 个基因差异表达, 包括 4 个新发现基因, 同时鉴定出组织特异性基因、肿瘤特异性基因等。国内的何志巍^[3,4]、张恒等^[5] 也对肺鳞癌进行了相关的研究。Goodwin 等^[6] 探索了细支气管肺泡癌与良性肺组织的基因表达模式。学者们通过对肺腺癌的研究, 发现其分子亚型的存在^[7,8]。

小细胞肺癌虽然对化疗敏感, 但易产生耐药, 且在诊断时, 常已发生广泛转移, 因此探索小细胞肺癌的发病机制, 寻找早期敏感的肿瘤标记物和新的药靶非常重要。Bangur 等^[9] 结合 CDNA 削减杂交和 CDNA 微阵列的方法分析了 32 例小细胞肺癌组织和正常组织的表达谱, 鉴定出在小细胞肺癌中高表达的 209 个基因, 它们涉及细胞周期调节、细胞凋亡、蛋白合成和分解, 转录基因和癌基因等, 其中, 他们对 9 个显著高表达基因进行了进一步分析, 这些基因特征性报道将有助于发掘它们诊断、预后、治疗的潜能。

近年来, 利用基因表达谱进行预后预测和疗效评价也取得了较大进展。如 Beer 等利用基因表达谱对 1 期肺腺癌病人的生存进行预测, 鉴别出高危组和低危组, 使得高危组可从随后的辅助治疗中获益^[10]。

综上所述, 肺癌的基因表达谱使我们对肺癌有了一个全新的认识, 这些必然导致早期诊断和个体化治疗的进一步发展。

2 分子分型的研究

目前, 肺癌的临床分期是 TNM 分期, 病理的分类依据是细胞组织来源, 形态学、蛋白标记物和生物学行为等标准, 显然基因表达谱则是以上所有这些的分子基础, 从基因水平分类肺癌可以在传统的分类基础上发现新的类型或亚型, 并且可以为更真实

收稿日期: 2004-05-10; 修回日期: 2004-06-10

作者单位: 510080 广州, 广东省人民医院医学研究中心、广东省肺癌研究所

准确的综合评估肺癌患者提供客观依据。

Arindam 等^[8]利用基因芯片对 127 例肺腺癌、21 例肺鳞癌、20 例类癌、6 例小细胞肺癌、17 例正常肺组织和 12 例肺转移腺癌组织进行分子分型的研究。结果发现它们都各自归属到不同类中,与传统的分类方法一致,说明基于基因芯片的分类方法是可靠的。研究发现除腺癌不能以单一套分子标记划分外,其他肺癌均有一套特异的标记基因。正常肺组织与肿瘤组织是截然不同的组,标记基因包括 TGF-受体, tetranectin, fic plin3 等。小细胞肺癌与类癌都高表达神经内分泌基因,但它们相同的标记基因很少,类癌是由一套明显不同的基因组所定义的,提示它是肺癌中的一个明显不同的分支。而小细胞肺癌高表达 PCNA、MCM2MCM6、胸腺素和细胞周期抑制因子 p18 等。在鳞癌中,与鳞状细胞分化的基因高表达,如细胞角蛋白、p63 等。腺癌异质性很大,不能以单一套标记基因划分,经过进一步的数据处理,它们被分成 4 个亚型。C1 高表达细胞分裂和增殖相关基因;C2 特异表达几种神经内分泌基因,如多巴脱羧酶、丝氨酸蛋白酶、血管舒缓素 11 等;C3 表达鸟氨酸脱羧酶 1 和谷胱甘肽-S-转移酶和型肺泡标记物,如甲状腺转录因子 1、表面活化蛋白 B、C、D 基因等;C4 高表达细胞色素 b5, 组织蛋白酶 H, 上皮黏蛋白 1 等。作者探讨了不同亚型与组织学、吸烟史以及预后的关系,显示 C2 的预后最差,而 C4 的最好。有关的研究正在继续。

Garber 等也对肺癌进行了分子分型的研究,得出的结果相似,但他们把腺癌分为 3 个亚型^[7]。

分子分型的出现,初步解析了为什么即使是同一临床分期的腺癌病人的治疗与预后差异很大,也揭示了不同类型肺癌的分子基础,提示这种完全基于基因表达谱的肿瘤分类方法是切实可行的。

3 肺癌分子流行病学的研究

近年来,肺癌分子流行病学研究开始把特定的环境、致癌物和肿瘤进展的突发事件相关联。尽管流行病学证据提示肺癌大多数病例直接与吸烟相关,和非吸烟患者相比,吸烟者有 10 倍的危险死于肺癌,但一些学者认为尚未发现吸烟引起肺癌的直接体内证据,如烟草中有害物质与细胞中 DNA 作用的有效剂量及其作用,是否会直接引起癌基因或抑癌基因的改变,为什么在相当一部分吸烟者中不发生肺癌,为此,许多学者进行了更深入的研究。Powell 等^[10]利用寡核苷酸芯片分析了 6 组配对的吸烟者和非吸烟者的肺癌组织的表达谱,结果显示它们的表达谱显著差异。即使在正常肺组织中,吸

烟者与非吸烟者也明显不同。研究者进一步研究了 GPC3 基因,发现其在吸烟者的正常肺组织中低表达,在肿瘤组织中表达水平更低。经 Northernblot 验证后,研究者把 GPC3 基因转染至肺癌细胞株中,体外观察到 GPC3 基因有抑制生长的作用,结果在动物模型上进一步验证。提示 GPC3 是候选的抑癌基因,它的表达水平可能受到烟草暴露的调控。

另一项吸烟引起肺癌的证据来源于 Ahrendt 等^[12]的研究。他们利用 p53 基因芯片测定了 105 个非小细胞肺癌患者标本中 p53 的突变,得出结论:吸烟和饮酒都与非小细胞肺癌患者 p53 基因突变相关,酒精或许增加吸烟对 p53 基因突变的可能性。同时也证明了利用基因芯片可以节省大量时间,而且比直接测序要敏感得多,同时基因芯片特异性 98%,比直接测序 100% 仅相差 2%。

除吸烟与肺癌分子流行病学研究以外,Zhao 等^[12]利用 CDNA 微阵列进行石棉诱导的人类支气管上皮的致瘤差异表达基因的检测,结果揭示胰岛素受体通路的激活和 DCC、KU70 的失活共同参与石棉诱导的人肺支气管上皮恶性转化。此外,有学者也探讨了 Cr 对肺癌的作用^[14]以及绿茶抗癌机理^[15]等等。

利用基因芯片进行的肺癌分子流行病学研究更明确了吸烟与肺癌的关系,也揭示了其他致癌物在体内暴露的生理作用和致癌机制。

4 肺癌转移的相关研究

肺癌的复发转移是肺癌致死的主要原因。对肺癌转移的相关研究有助于我们更好的理解和控制肺癌,指导诊断、治疗和预后。

几位学者应用基因芯片对肺癌的转移进行了有益的探索,他们建立了不同转移能力的细胞模型,然后比较它们的基因表达模式,从中找出与肿瘤转移密切相关的基因,结果再通过 Northernblotting、Rt-PCR 等验证以及细胞水平、动物水平的进一步的考察,多方面分析了肺癌的转移,为诊断和治疗提供了许多重要的线索。

如 Shih 等^[16]通过上述方法发现肺癌的转移涉及细胞黏附、移动、血管生成、信号传导等许多基因的参与。他们深入研究了其中显著高表达的 CRMP-1 基因,结果显示其表达的降低与疾病的进展、淋巴结转移、早期术后的复发、短的生存期显著相关,提示 CRMP-1 基因可能是一个转移抑制基因,参与肿瘤的侵袭和转移。Gernma 等^[17]研究发现在肺癌高转移细胞株中,基质金属蛋白酶-2 (MMP-2),纤溶酶原激活抑制因子-1 (PAI-1),白介

素-1(IL-1)等表达上调,而 CEA、FAS 配体、Cyclin E、CyclinB1、Kt67、PCNA 和 CD44 等表达下调,提示肺癌的转移是多个基因改变的综合结果。Kozaki 等^[18]通过研究发现高转移细胞株中表达许多与炎症因子相关基因,他们认为肺癌的转移可能模仿炎症细胞浸润的过程,各种抑制炎症信号传导通路的方法可能对肺癌的转移有用。

5 在肺癌耐药和药物作用机制方面的研究

肺癌化疗失败的原因之一是对化疗药物耐药。有关探讨肺癌化疗耐药的文献不多, Komatani 等^[19]研究了抗肿瘤药物 NB-506 和 J-107088 的耐药机制, NB-506 和 J-107088 是强有力的拓扑异构酶抑制剂。他们建立了这两种药的耐药细胞株,然后通过寡核苷酸芯片对 34020 个基因进行分析,发现一个 ATP 结合盒输运器 BCRP[乳癌耐药蛋白/MXR/ABCP (BCRP)]显著高表达,经 BCRP 转染的人类肺癌细胞株 PC13,显示 22 倍和 17 倍耐药于 NB-506 和 J-107088,而对其他抗肿瘤药物不耐药,结果提示了一种新的以 BCRP 介导的耐药机制。

基因芯片也为研究肿瘤药物的作用机制提供了强有力的工具。TZT-1027 是一种新的微管干扰剂,它直接作用于微管蛋白,抑制微管蛋白的聚合,阻止细胞的有丝分裂,但它的分子机制和药物毒性并未完全清楚。Natsume 等^[20]通过基因芯片对经 TZT-1027 处理的非小细胞肺癌细胞株和星形胶质细胞进行分析,以探讨 TZT-1027 的作用途径和神经毒性。结果发现 TZT-1027 改变了许多基因的表达,包括编码细胞周期和生长因子及细胞因子等。但非小细胞肺癌细胞株表达的基因与星形胶质细胞表达的基因不一样,有些基因特异在非小细胞肺癌细胞株中表达,而有的只在星形胶质细胞中表达,提示这些基因的改变是抗肿瘤和神经毒性的作用基础。其他学者也进行了相关的研究。Dan 等^[21]利用基因芯片鉴别出经阿霉素治疗后的肺癌细胞系 A549 导致 G2 停止的上调基因和下调基因,发现细胞周期蛋白 B1 减少。Kiguchi 等^[22]研究发现葱环霉素是通过诱导尿激酶型血浆素原激活剂而起抗肿瘤作用的。

基因芯片还可以进行抗肿瘤药物的筛选。总之,基因芯片改变了传统药物的发现、筛选、验证过程,从而带动了药物基因组学的迅速发展。

6 基因功能的研究

人类基因组完全测序以后,研究焦点已经从结构基因组转向功能基因组,作为一种高通量的技术,

基因芯片在其中扮演着越来越重要的角色。

抑癌基因 p53 是肿瘤研究最多的明星基因,但限于传统的方法学,p53 基因的调节网络还有许多不明之处。Kannan 等^[23]巧妙地建立了一种人类肺癌细胞株,它表达对温度敏感的鼠型 p53 基因。通过改变温度至 32℃,使 p53 基因灭活,从而在不同时间段内观察各种基因的表达改变。由于 p53 基因可能先作用于某些关键基因,而这些基因的改变使相应的蛋白质合成发生改变,从而引起下一步更多基因的改变,形成一个调控网络。于是作者应用蛋白质合成抑制剂放线菌酮,阻断蛋白合成在 p53 作用后的第一步。通过基因芯片的分析,找出 p53 基因首先作用的靶基因和随后作用的基因,对 p53 基因的调控网络有了一个更深入的理解。相关方面的研究还有,抑癌基因 S100A2 在肺癌早期发生中的作用^[24],以及视黄醛受体在提高肿瘤细胞的免疫原性的作用等^[25]。

7 组织芯片与蛋白芯片

组织芯片与蛋白芯片是随着基因芯片的发展而发展起来的两种高通量技术,可从蛋白质水平进一步研究基因的表达情况。组织芯片的优势在于可同时分析多个样本中某一蛋白的表达情况,它实际上是免疫组化的微型化和集约化,但比传统的免疫组化更简便、快速和准确。在肺癌研究中,组织芯片扮演着十分重要的角色。如 By 等^[26]利用构建的 193 例从 I 期到 IV 期的非小细胞肺癌病人的组织芯片,检测多种蛋白的表达,通过分析不同分期病人的表达情况,发现 E-钙粘蛋白是非小细胞肺癌的独立预后因子。蛋白芯片在肺癌中的应用也取得了喜人的进展,如利用蛋白芯片探索肺癌的肿瘤标志物^[27],基于蛋白芯片的肺癌分类^[28]等。毫无疑问,它与基因芯片、组织芯片联合应用将为肺癌研究提供更多线索。

8 存在不足与展望

肺癌是世界公认的难治性疾病,诊断与治疗的失败归根到底是我们对肺癌的本质缺乏深刻的理解。生物芯片的出现,为肺癌研究揭开了崭新的篇章,它与传统方法的互补应用必将焕发无穷的魅力。但不可否认的是,由于肺癌的复杂性,研究工作仍将十分艰巨。同时,我国芯片技术才刚刚起步,有许多待完善的地方,如存在较高的假阳性、假阴性,没有公认的参照标准,对海量数据缺乏高效的数据挖掘等问题。可喜的是,有不少学者已经致力于探索新的芯片材料,优化芯片的制作,简化实验方法,减少

假阳性、假阴性,并向微型芯片实验室靠拢,以实现芯片操作的全自动化。生物信息学家则寻找除聚类方法外的更高效的计算方法,对基因表达信息进行分析 and 提炼。相信在不久的将来,芯片技术必将越来越完善,为人类健康作出更大的贡献!

参考文献:

- [1] Cojocaru G, Friedman N, Krupsky M, et al. Transcriptional profiling of non-small cell lung cancer using oligonucleotide microarrays [J]. *Chest*, 2002, 121 (3 Suppl): 44S.
- [2] Wang T, Hopkins D, Schmidt C, et al. Identification of genes differentially over-expressed in lung squamous cell carcinoma using a combination of DNA subtraction and microarray analysis [J]. *Oncogene*, 2000, 19 (12): 1519-1528.
- [3] 何志巍, 许亮国, 任彩萍, 等. 人鼻咽与鼻咽癌及肺癌基因表达谱差异 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 1999, 26 (5): 446-450.
- [4] 何志巍, 许亮国, 任彩萍, 等. 用 cDNA 阵列研究人肺癌与正常肺及胚肺组织基因表达谱 [J]. *癌症*, 1999, 18 (5): 489-491.
- [5] 张恒, 刘芝华, 李泽坚, 等. 利用微阵列技术初步分析肺鳞癌组织中的基因表达谱 [J]. *中国肿瘤临床*, 2001, 28 (3): 172-175.
- [6] Goodwin LO, Mason JM, Haddad SI. Gene expression patterns of paired bronchioloalveolar carcinoma and benign lung tissue [J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2001, 31 (4): 369-375.
- [7] Garber ME, Olgam G, Karsten S, et al. Diversity of gene expression in adenocarcinoma of the lung [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98 (24): 13784-13789.
- [8] Arindam B, William G R, Jane S. Classification of human lung carcinoma by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98 (24): 13790-13795.
- [9] Bangur CS, Switzer A, Fan L, et al. Identification of genes over-expressed in small cell lung carcinoma using suppressive subtractive hybridization and cDNA microarray expression analysis [J]. *Oncogene*, 2002, 21 (23): 3814-3825.
- [10] Beer DG, Kardia SL, Huan G C, et al. Gene expression profiles predict survival of patients with lung adenocarcinoma [J]. *Nat Med*, 2002, 8: 816-824.
- [11] Powell CA, Xu G, Filmus J, et al. Oligonucleotide microarray analysis of lung adenocarcinoma in smokers and nonsmokers identifies GPC3 as a potential lung tumor suppressor [J]. *Chest*, 2002, 121 (3 Suppl): 6S-7S.
- [12] Ahrendt SA, Chow JT, Yan G S, et al. Alcohol consumption and cigarette smoking increase the frequency of p53 mutations in non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Res*, 2000, 60 (12): 3155-3159.
- [13] Zhao YL, Piao CQ, Wu LJ, et al. Differential expression of genes in asbestos-induced tumorigenic human bronchial epithelial cells: implication for mechanism [J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21 (11): 2005-2010.
- [14] Ye J, Shi X. Gene expression profile in response to chromium-induced cell stress in A549 cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2001, 222 (1-2): 189-197.
- [15] Okabe S, Fujimoto N, Sueoka N, et al. Modulation of gene expression by (-)-epigallocatechin gallate in PC-9 cells using DNA expression array [J]. *Biol Pharm Bull*, 2001, 24 (8): 883-886.
- [16] Shih JY, Yan G S, Hong TM, et al. Collagenase-1 and matrix metalloproteinase-1 in invasion and metastasis of cancer cells [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93 (18): 1392-1400.
- [17] Gemma A, Takenaka K, Hosoya Y, et al. Altered expression of several genes in highly metastatic subpopulations of a human pulmonary adenocarcinoma cell line [J]. *Eur J Cancer*, 2001, 37 (12): 1554-1561.
- [18] Kozaki K, Koshikawa K, Tatematsu Y, et al. Multifaceted analyses of highly metastatic human lung cancer cell line NCI-H460-LNM35 using a mimic of inflammatory cells in metastasis [J]. *Oncogene*, 2001, 20 (31): 4228-4234.
- [19] Komatani H, Kotani H, Hara Y, et al. Identification of breast cancer resistant protein/ mitoxantrone resistance/ placenta-specific, ATP-binding cassette transporter as a transporter of NB-506 and J-107088, topoisomerase inhibitors with an indolocarbazole structure [J]. *Cancer Res*, 2001, 61 (7): 2827-2832.
- [20] Natsume T, Nakamura T, Koh Y, et al. Gene expression profiling of fexiposure to TZT-1027, a novel microtubule-interfering agent, in non-small cell lung cancer PC-14 cells and astrocytes [J]. *Invest New Drugs*, 2001, 19 (4): 293-302.
- [21] Dan S, Yamori T. Reexpression of cyclin B1 expression after treatment with Adriamycin, but not cisplatin in human lung cancer A549 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 280 (3): 861-867.
- [22] Kiguchi T, Niiya K, Shibakura M, et al. Induction of urokinase-type plasminogen activator by the anthracycline antibiotic icinoman RC-K81 lymphoma and H69 lung carcinoma cells [J]. *Int J Cancer*, 2001, 93 (6): 792-797.
- [23] Kannan K, Amarioglio N, Rechavi G, et al. DNA microarray identification of primary and secondary target genes regulated by p53 [J]. *Oncogene*, 2001, 20 (18): 2225-2234.
- [24] Feng G, Xu X, Youssef EM, et al. Diminished expression of S100A2, a putative tumor suppressor, at early stages of human lung carcinogenesis [J]. *Cancer Res*, 2001, 61 (21): 7999-8004.
- [25] Sakaue M, Adachi H, Dawson M, et al. Induction of Egr-1 expression by the retinoid AHPN in human lung carcinoma cells is dependent on activated ERK1/2 [J]. *Cell Death Differ*, 2001, 8 (4): 411-424.
- [26] Beyer R M, Bremnes R, Veve E, Gabrielson E, et al. High-throughput tissue microarray analysis used to evaluate biological and prognostic significance of the E-cadherin pathway in non-small cell lung cancer [J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2002, 20 (20): 2417-2428.
- [27] 何大澄, 肖雪媛, 唐颖, 等. 应用蛋白质芯片技术从血清中筛选肺癌标志蛋白 [J]. *中国蛋白质组学首届学术大会论文摘要*, 2003, 9.
- [28] Yanagisawa K, Shi Y, Xu B J, et al. Proteomic patterns of tumor subsets in non-small cell lung cancer [J]. *Lancet*, 2003, 362 (9382): 415-416.

[编辑:张麟;校对:杨卉]