

- [21] 李知娟. 急诊冠脉搭桥术围术期 IMA、H-FABP 的变化[D]. 河北大学, 2013.
- [22] Chowdhury UK, Malik V, Yadav R, et al. Myocardial injury in coronary artery bypass grafting: on-pump versus off-pump comparison by measuring high-sensitivity C-reactive protein, cardiac troponin I, heart-type fatty acid-binding protein, creatine kinase-MB, and myoglobin release[J]. J Thorac Cardiovaac Surg, 2008, 135(10):1110-1119.
- [23] Malik V, Kale SC, Chowdhury UK, et al. Myocardial injury in coronary artery bypass grafting, on-pump versus off-pump com-

parison by measuring heart-type fatty-acid-binding protein release [J]. Tex Heart Inst J, 2006, 33(3):321-327.

- [24] 于立峰, 李敬田, 杨建美. 心型脂肪酸结合蛋白在冠心病患者行 PCI 治疗前后的变化及意义[J]. 山东医药, 2011, 51(1):100-101.
- [25] 张丽梅, 王春明, 鲍迎春, 等. H-FABP 对冠脉支架术后近期心血管事件的预测[J]. 心脑血管病防治, 2013, 13(1):108-110.
- [26] 张健, 李春盛. 心型脂肪酸结合蛋白在心肌梗患者行介入治疗中的意义[J]. 中华急诊医学杂志, 2013, 22(6):612-615.

(收稿日期:2015-02-28)

• 综 述 •

大肠癌基因表达谱研究进展

杨秀珍¹, 彭云香², 王庆锋³ 综述, 曹林林^{1△} 审校

(1. 淄博市中心医院检验科, 淄博 255036; 2. 天津市第五中心医院检验科, 天津 300457;
3. 淄博市中心医院胃肠外科, 淄博 255036)

关键词: 大肠癌; 基因表达谱; 基因芯片

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.14.060

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)14-2089-03

随着人口老龄化的加剧、环境污染的加重、生活节奏加快、饮食结构变化及疾病诊断水平的提高, 肿瘤发生率也不断地增高^[1]。在世界范围内, 大肠癌的发生率在恶性肿瘤中位列第 3, 在癌症引起死亡的病例中位列第 4, 且每年有数百万的新发病例^[2-3]。大肠癌是一种多基因、多步骤、多途径变化的疾病, 目前针对大肠癌的基因学检测手段已经由早期的单基因检测发展到多基因联合检测^[4]。全基因表达谱技术是一种基因芯片技术, 可用来筛选差异表达基因, 寻找新的分子标志物, 具有高信息量、高通量等优点, 可快速、准确地对数以千计的基因信息进行分析^[5]。从海量的生物标志信息中确定“有效”的基因标志物将是大肠癌诊治性研究的目标和方向。

1 大肠癌的发病机制与基因表达谱技术

1.1 大肠癌的发病机制 大肠癌包括结肠癌和直肠癌, 其发病机制比较复杂, 主要受遗传、环境等因素的影响。约 20% 的患者具有家族遗传史, 其余为散发病例, 基本遵循“腺瘤-腺癌”的演变过程。目前认为大肠癌主要通过以下几种重要的分子机制发病^[6]: 染色体不稳定(CIN)、微卫星不稳定(MSI)及 CpG 岛甲基化(CIMP)。而大肠癌的多步骤演进过程与多种基因的共同参与有关, 涉及的基因有 APC、DDC、k-ras、p53 及错配修复基因(MMR)hMSH2 和 hMLH1 等。

1.2 基因表达谱技术原理 基因芯片是目前最为先进的分子检测技术, 芯片可以在一次实验中同时监测成千上万的基因或蛋白质表达水平, 这项技术有可能彻底改变未来的生物学及医学领域, 并大大改变人类对于疾病的认识。微阵列用于研究基因表达的基因芯片主要有两种形式: cDNA 微阵列和寡核苷酸微阵列。基因表达谱分析技术是通过打印或光导化学方法在尼龙膜材料或硅玻片材料表面, 合成能够代表不同基因的成千上万个寡核苷酸探针, 同时利用放射性同位素或荧光素标记待测材料中的 DNA 或 cDNA, 然后将待测 DNA 或 cDNA 与探针进行杂交^[7], 采用放射自显影或激光共聚焦显微镜扫描杂交信号, 最后由计算机分析处理, 根据获得的杂交信号强度与分布模式反映目的材料中待测基因的表达水平^[8]。另外, 研究表

明用 59 mer 长度寡核苷酸探针制备基因芯片, 可以降低基因芯片的制作成本, 从而推动了基因芯片技术的普及应用^[9]。

2 基因表达谱技术与大肠癌的基础与临床研究

2.1 基因表达谱技术在大肠癌信号通路转导方面的研究 基因表达谱技术促进了大肠癌信号通路转导方面的研究。例如, 在针对候选抑癌基因 NGX6 的研究中, 刘芬等^[10]通过基因表达谱技术针对 NGX6 转染结肠癌细胞系 HT-29 前后差异表达基因进行了筛查, 结果表明, NGX6 基因的功能涉及细胞信号传导、细胞周期调控、细胞凋亡、细胞骨架和运动、DNA 转录结合、DNA 损伤修复等方面, 并推测 NGX6 可能通过参与调节重要的信号传导通路而发挥其抗肿瘤增殖和转移的作用。

2.2 基因表达谱技术在大肠癌转移相关的研究 肿瘤转移机制是肿瘤研究的热点, 基因芯片技术开辟了研究肿瘤转移相关分子机制的新模式^[11]。Koehler 等^[12]用基因表达谱技术分析大肠癌与其肝转移瘤的显著性差异基因, 并发现这些基因在其他多种肿瘤的发生、发展及转移过程中同样发挥重要的作用。程家乐等^[13]联合应用激光捕获显微切割和基因芯片技术, 构建伴有肝转移的大肠癌原发灶间质组织和不伴肝转移的大肠癌间质组织基因表达谱, 从间质中筛选与大肠癌肝转移相关的基因, 并对骨膜蛋白、胰岛素样生长因子 2(IGF-2)、过氧化物酶体增殖活化受体 γ 共激活因子(PGC-1)、趋化因子配体 21(CCL21)这 4 个显著差异性基因进行实时定量聚合酶链反应(PCR)检测, 证实了这一结论。另一项关于大肠癌早期转移相关差异表达基因的研究结果显示, 表达上调的基因分别为 VSNL1、PSAT1、KIAA1199、ABHD7、MMP7、JUB、CLDN1、KRT23 和 FOXQ1, 表达下调的基因分别为 SFRP1、SLC4A4、CHGA、GCG、GUCA2B、CLDN8 和 CD177, 经过分析与组织分化程度相关的基因有 PSAT1 和 JUB, 与肿瘤分期相关的基因有 VSNL1 和 MMP7^[14]。这一结果为寻找大肠癌肝转移临床早期诊断的分子标志物和靶向治疗提供了坚实的理论基础。

2.3 基因表达谱技术在大肠癌干细胞方面的研究 干细胞作为一种未分化的原始细胞, 具有自我更新、无限增殖及分化潜

能的特性。有学者认为肿瘤中存在肿瘤干细胞,并反映肿瘤的恶性程度。此外,认为大肠隐窝干细胞的异常增殖可以导致大肠肿瘤的发生。Fang 等和张珊珊等利用大肠癌 SW1116 细胞系对大肠癌干细胞微小 RNA(miRNA)表达谱进行研究^[15]。以 CD133 和 CD200 作为干细胞标志物,应用 Affymetrix 人类全基因组表达谱芯片检测 CD133⁺CD200⁺和 CD133⁻CD200⁻大肠癌细胞,通过对于可能对肿瘤发生、发展起调控作用的 31 个下调 miRNA 和 31 个上调 miRNA 的分析,筛选出 3 种大肠癌干细胞差异基因 MDM2、PRKACG 和 CACNA1G^[16]。

2.4 基因表达谱技术在正常大肠与大肠癌方面的研究 大肠作为消化系统重要组成部分,包括盲肠、升结肠、横结肠、降结肠、乙状结肠和直肠。研究人员发现胎儿的升结肠和降结肠中基因表达有差异,而成人的升结肠和降结肠间则含有更多的表达差异的基因,这一现象表明两部分结肠的差异虽然在胚胎时已确定,但绝大部分是在后天形成的^[17]。当发生癌变时,近段与远段大肠癌之间的基因表达也具有明显差异^[18-19]。许红民等^[20]利用全基因组寡核苷酸表达分析技术对 9 例大肠癌组织进行检测,发现了 STAB1、MMP1、TNA 等 17 个最重要的差异表达基因。Chang 等^[21]通过比较大肠癌患者与健康人的外周血中 RNA 的基因表达差异,发现了 MDM2、DUSP6、CPEB4、MMD 和 EIF2S3 5 种表达明显差异的基因。为了构建正常结肠上皮组织和结肠癌组织基因表达谱筛选结肠癌相关基因,樊军卫等^[22]应用激光捕获显微切割线性扩增全基因组基因芯片技术,对结肠癌组织及其相应正常结肠上皮组织构建基因表达谱,筛选差异表达基因。通过大肠癌表达谱筛选的前 20 条差异基因中,其中 10 条基因涉及肿瘤浸润转移、细胞粘附、蛋白质泛素化等,13 条基因可能与结肠癌发生、发展相关。另外,该小组人员通过 LongSAGE 文库筛选出结肠癌差异表达基因 705 个^[23]。赖铭裕等^[24]利用基因表达谱技术筛选结肠癌与正常黏膜组织的差异表达基因 1 714 条,上调基因 992 条,下调基因 722 条,27.13% 的差异表达基因与蛋白质结合相关。阴常欣等^[25]用 BRB Array Tools 对公共基因芯片数据库 GEO 中的结肠腺瘤、结肠癌基因芯片表达数据进行统计学分析,104 条共同表达基因中,共同上调基因 48 条,共同下调基因 56 条,该差异基因与物质的代谢、内环境的稳态、细胞的增殖等肿瘤发生及发展过程有密切关联。刘志荣等^[26]用 HG-U133Plus2.0 基因芯片,对大肠腺瘤组织、癌组织和正常组织基因表达谱技术和生物信息学方法分析,腺瘤组织与正常组织比较发现 1 892 个表达差异基因及表达序列标签(ESTs);腺瘤组织与癌组织共同与正常组织比较发现 602 个表达相同的基因及 ESTs,这些表达相同的基因可能与早期大肠癌的启动和演化有关。张媛等^[27]研究结直肠癌中 miRNAs 的差异表达发现,结肠癌中有 25 个 miRNAs 表达明显异常,包括 15 个上调和 10 个下调的 miRNAs,其中 miR-105 与结直肠癌的病理分型、临床分期、淋巴结转移及远处转移等均呈正相关,因此 miRNAs 特异度表达很有可能成为结直肠癌诊断与治疗的潜在分子靶点。

2.5 基因表达谱技术在大肠癌其他方面的研究 Elizabeth 等^[28]利用微阵列技术研究大鼠由氧化偶氮甲烷诱导的大肠致癌后基因表达谱。基因表达谱技术在大肠癌筛查放化疗敏感基因等方面也发挥重要的作用,从而促进临床的个体化治疗进程。邢春根等^[29]应用基因芯片技术初步筛选人大肠癌细胞辐射敏感相关基因,因此制定辐射敏感性诊断性的基因芯片,将来可用于大肠癌放疗适宜人群的筛选以实现放疗的个体化。

在中医方面周小军等^[30]初步建立了大肠癌虚实不同证候-蛋白质表达谱,发现 21 个差异表达蛋白质:热休克蛋白、细胞骨架蛋白、抗氧化蛋白、信号转导相关蛋白、能量产生相关蛋白、血液蛋白等。

3 前景及问题

基因芯片包含的基因数成千上万倍的增长,筛选的差异基因不断增多,然而基因芯片目前存在成本昂贵、操作复杂、分析范围较狭窄等问题,只能局限于实验室,很难广泛应用于临床,但随着生物技术的进步和生物信息的发展,基因芯片技术也将不断地发展和改进^[31],相信不久基因芯片技术能够进入临床,基因芯片技术在大肠癌的研究中将发挥更大作用,基因表达谱芯片将会在肿瘤的个体化治疗中发挥更大的作用。

综上所述,近年来大肠癌的基础和临床研究已取得了极大的进展,为大肠癌的早期诊断、中晚期生物治疗及随访监测等提供了大量的理论依据。同其他肿瘤一样,大肠癌多种基因表达模式在基因调控机制方面有待于深入的探讨。

参考文献

- [1] 万德森.结直肠癌流行病学与预防[J].中国中西医结合外科杂志,2011,17(1):3-7.
- [2] Tenesa A, Dunlop MG. New insights into the aetiology of colorectal cancer from genome-wide association studies[J]. Nat Rev Genet, 2009, 10(6): 353-358.
- [3] Bezerra-De-Souza DL, Bernal MM, Gómez FJ, et al. Predictions and estimations of colorectal cancer mortality, prevalence and incidence in Aragon, Spain, for the period 1998-2022[J]. Rev Esp Enferm Dig, 2012, 104(5): 518-523.
- [4] Kim ER, Kim YH. Clinical application of genetics in management of colorectal cancer[J]. Intest Res, 2014, 12(3): 184-193.
- [5] 孙继勇. 基因芯片核心技术及其最新进展[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(5): 467-471.
- [6] 王新颖, 姜泊. 大肠癌发病机制基础研究进展与展望[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2011, 20(3): 197-199.
- [7] Choudhuri S. Microarrays in biology and medicine[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2004, 18(4): 171-179.
- [8] 潘继红, 韩金祥. cDNA 微阵列与寡核苷酸芯片的制备方法[J]. 国外医学分子生物学分册, 2003, 25(1): 50-54.
- [9] 任永红, 张科, 孙清岚, 等. 高性价比寡核苷酸基因表达谱芯片的制备方法[J]. 中国医药生物技术, 2010, 5(1): 38-42.
- [10] 刘芬, 王晓艳, 连平, 等. NGX6 对结肠癌细胞基因表达谱的影响[J]. 癌症, 2005, 24(9): 1064-1070.
- [11] Kahlert C, Pecqueux M, Halama N, et al. Tumour-site-dependent expression profile of angiogenic factors in tumour-associated stroma of primary colorectal cancer and metastases[J]. Br J Cancer, 2014, 110(2): 441-449.
- [12] Koehler A, Bataille F, Schmid, et al. Gene expression profiling of colorectal cancer and metastases divides tumours according to their clinicopathological stage[J]. J Pathol, 2004, 204(1): 65-74.
- [13] 程家乐, 姚敬, 彭佳远. 大肠癌肝转移相关的间质差异表达基因的筛选[J]. 医学综述, 2014, 20(5): 903-906.
- [14] 齐鲁, 丁彦青. 基于差异表达基因探索大肠癌早期转移相关分子机制[J]. 中国科学: 生命科学, 2013, 43(7): 579-588.
- [15] Fang Y, Xiang J, Chen Z, et al. miRNA expression profile of colon cancer stem cells compared to non-stem cells using the SW1116 cell line[J]. Oncol Rep, 2012, 28(6): 2115-2124. (下转第 2116 页)

至错误的治疗,实验室建立生物参考区间工作意义重大^[5]。生物参考区间的建立,应充分考虑到区域、种族、人群、性别、年龄等因素进行科学合理的研究^[6]。2012 年 12 月卫生部发布了《临床常用生化检验项目参考区间》行业标准并推荐从 2013 年 8 月 1 日起实行。但因我国地域广阔,民族众多,该标准建立时,因涵盖区域及民族有限,所以各实验室在采用新标准时,有必要对此标准的可靠性和适用性进行验证,既可保证医疗安全,也可在今后在全国大范围内使用统一的、适合中国人群的参考区间提供更加可靠的数据支撑。

房山区位于北京市西南郊区,常住人口约 65 万,饮食习惯比较一致。体检人群以本地人群为主,利用该人群进行参考区间验证,有很好的代表性。验证结果对于此行业标准在房山地区的实施,以及对于临床病症的解释与判断、学生体检、单位招工都具有重要的指导作用。

本研究中验证的 6 项生化指标在各医院临床生化检验中开展最普遍,是评价肝功能的重要指标,同时也影响检验结果的互认。根据 WS/T 404-2012 卫生行业标准中提供的参考区间评估、验证和使用要求,在进行参考区间评估和验证时,参考个体多于 20 个,超出参考区间的数据不超过 10%则通过验证^[1-2]。在本研究中,参与验证的个体数为 5 798 例,其中男 3 046 例,女 2 752 例,适用本规则。男性 ALT、女性 ALT、男性 AST、TP 统计结果超出参考区间比率分别为 1.5%、0.3%、1.5%和 1.6%,超出参考区间的数据不超过 10%,通过验证。女性 AST、ALB、GLB 和 A/G,结果均在新行业标准参考区间内。

参考区间的验证工作,是现代实验室管理的基本要求,是保证临床安全的重要环节。美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)C28-A2 文件推荐临床实验室生物参考区间确立的

方法,除建立生物参考区间外,另一个途径是引用权威书刊、厂家试剂说明书或转移其他医院实验室的生物参考区间并通过验证^[4]。笔者通过对本院 2013 年的体检数据的分析,ALT、AST、TP、ALB、GLB、A/G,6 个指标均与 WS/T 404-2012《临床常用生化检验项目参考区间》第 1 部分和第 2 部分给出的参考区间完全相符,本研究选取的 5 798 例个体,人员分布在 101 个体检单位,地域遍布整个房山区,数据具有很好的代表性。由此证明,此次新颁布的 WS/T 404-2012《临床常用生化检验项目参考区间》第 1 部分和第 2 部分项目完全适用于北京市房山区的健康人群,可用于体检及临床诊断参考,并可以在本区域内其他临床实验室进行推广。

参考文献

[1] 魏有仁. 参考值的几个基本问题[J]. 中国试验诊断学,1997,(1): 1-3.

[2] 中华人民共和国卫生部. 临床常用生化检验项目参考区间 第 1 部分:血清丙氨酸氨基转移酶、天门冬氨酸氨基转移酶、碱性磷酸酶和 γ-谷氨酰基转移酶[S]. 北京:中华人民共和国卫生部,2012.

[3] 中华人民共和国卫生部. 临床常用生化检验项目参考区间第 2 部分:血清总蛋白、白蛋白[S]. 北京:中华人民共和国卫生部, 2012.

[4] 中国合格评定国家认可委员会. ISO15189:2012 医学实验室质量和能力认可准则[S]. 北京:中国计量出版社,2012.

[5] 陈桂山,杨有业,梁锦胜,等. 临床医学实验室生物参考区间的建立[J]. 检验医学,2008,23(4):421-424.

[6] 徐娟,王华国. 区域血细胞分析参考区间验证的探讨[J]. 健康之路,2013,20(2):173-175.

(收稿日期:2015-01-08)

(上接第 2090 页)

[16] 张珊珊,黎丽旋,黄载伟. 基因芯片技术筛选和鉴定 CD133⁺CD200⁺大肠癌干细胞相关基因[J]. 南方医科大学学报,2013,33 (12):1787-1791.

[17] Glebov OK, Rodriguez LM, Nakahara K, et al. Distinguishing from left colon by the pattern of gene expression [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,2003,12(8):755-762.

[18] Birkenkamp-Demtroder K, Olesen SH, Sørensen FB, et al. Differential gene expression in colon cancer of the caecum versus the sigmoid and rectosigmoid [J]. Gut,2005,54(3):374-384.

[19] Komuro K, Tada M, Tamoto E, et al. Right and left-sided colorectal cancers display distinct expression profiles and the anatomical stratification allows a high accuracy prediction of lymph node metastasis[J]. J Surg Research,2005,124(2):216-224.

[20] 许红民,王强,白雪娟,等. 利用全基因组寡核苷酸筛选大肠癌差异表达基因[J]. 第一军医大学学报,2005,25(9):1109-1113.

[21] Chang YT, Huang CS, Yao CT, et al. Gene expression profile of peripheral blood in colorectal cancer[J]. World J Gastroenterol, 2014,20(39):14463-14471.

[22] 樊军卫,周崇治,袁国强,等. 纯化结肠癌组织基因表达谱的变化 [J]. 中华实验外科杂志,2007,24(8):905-907.

[23] 樊军卫,唐华美,严东旺,等. 结肠癌实质细胞长标签基因表达系列分析文库的建立和应用[J]. 肿瘤,2010,30(6):505-509.

[24] 赖铭裕,聂家艳,黄杰安,等. 结肠癌与正常组织基因表达谱的差异性研究[J]. 实用医学杂志,2009,25(21):3557-3559.

[25] 阴常欣,马文丽,朱秀兰,等. 结肠腺瘤和结肠癌基因表达谱分析 [J]. 山东医药,2008,48(40):25-27.

[26] 刘志荣,尹云勤,李美宁,等. 用基因芯片筛选早期大肠癌相关基因[J]. 山西医科大学学报,2008,39(4):297-301.

[27] 张媛,林贞花,金铁峰,等. 结直肠癌中 miRNAs 差异表达谱的筛查[J]. 世界华人消化杂志,2014,22(30):4578-4587.

[28] Rondini EA, Bennink MR. Microarray analyses of genes differentially expressed by diet (black beans and soy flour) during azoxymethane-induced colon carcinogenesis in rats[J]. J Nut Metab, 2012,2012:351796.

[29] 邢春根,杨晓东,周立英,等. 大肠癌辐射敏感相关基因的筛选 [J]. 辐射研究与辐射工艺学报,2007,25(4):252-255.

[30] 周小军,周福生,孔梅,等. 大肠癌虚实证候与蛋白质差异性表达的研究[J]. 中华中医药杂志,2011,26(8):1808-1812.

[31] Chu CM, Yao CT, Chang YT, et al. Gene expression profiling of colorectal tumors and normal mucosa by microarrays meta-analysis using prediction analysis of microarray, artificial neural network, classification, and regression trees[J]. Dis Markers, 2014;634123.

(收稿日期:2015-03-10)