

Methods, 2005, 61(3):399-412.

- [13] 刘朝晖, 张盛斌, 王汉平, 等. 运用变性高效液相色谱快速检测 CTX-M 超广谱 β-内酰胺酶基因型[J]. 中国感染与化疗杂志, 2006, 6(6):764-767.
- [14] Tzouveleki LS, Tzelepi E, Tassios PT, et al. CTX-M-type beta-lactamases: an emerging group of extended-

spectrum enzymes[J]. Int J Antimicrob Agents, 2000, 14(2):137-142.

- [15] 舒艳, 况九龙. 肺炎克雷伯菌产超广谱 β-内酰胺酶研究进展[J]. 山东医药, 2011, 51(21):110-112.

(收稿日期:2011-10-12)

生物芯片技术在消化道肿瘤研究中的应用进展

李先茜 综述, 余 琛 审校(上海市徐汇区中心医院中心实验室 200031)

【关键词】 基因芯片; 消化道肿瘤; 微流体技术; 分子印刷技术; 毫微秒技术

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2012. 07. 041 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2012)07-0850-02

随着人类基因组计划(HGP), 即全部核苷酸测序的完成, 人类基因组研究的重心逐渐转向功能基因组。由此, 产生了一个大规模基因分析工具——基因芯片。基因芯片又称 DNA 微阵列(DNA microarray), 是近年发展起来的一项 DNA 分析技术, 一般包括寡核苷酸芯片和 cDNA 芯片两种。其基本原理是将成千上万个代表不同基因的寡核苷酸或 cDNA“探针”密集而有规律地排列在固相支持物表面, 通过与标记目的材料中的 DNA 或 cDNA 杂交, 再对获得的信号应用扫描仪和相关软件进行分析。该技术具有高通量、高效率 and 样本量少等特点。正常基因的突变、癌基因的异常激活以及抑癌基因的失活、基因本身的多效性和机体免疫因素决定了肿瘤表型的表达与否^[1]。通过对肿瘤基因表达谱的深入研究, 有助于很好地定性肿瘤, 揭示相似组织病理类型和不同临床特征的亚临床分类, 而且可以帮助确定不同肿瘤的治疗敏感性和判断预后, 对肿瘤基因表达谱的分析寻找新的治疗靶点, 为分子肿瘤学书写了新的篇章^[2]。本文就生物芯片在消化道肿瘤研究中的应用进展作一综述。

1 生物芯片

目前, 生物芯片主要包括 DNA 芯片、蛋白质芯片和肽芯片、碳水化合物芯片、组织芯片和细胞芯片、芯片实验室。

1.1 DNA 芯片 DNA 芯片原理主要是应用单色或双色荧光技术, 可以对许多基因进行定量基因表达分析。单色荧光分析技术最初应用于采用影印石版术制作的芯片。Affymetrix 公司将此芯片技术申请专利, 商品名为 GeneChip™。应用该项技术, 每例样本的表达谱产生于单色荧光(如藻红蛋白)标记的芯片之上, 通过对不同的图像加以比较来进行检测。接着建立了双色荧光分析技术, 即两种 RNA 样本分别用不同的荧光染料进行标记, 如靛菁 3 和靛菁 5。这些标记探针与微阵列 cDNA 先进行杂交, 然后进行荧光扫描, 荧光信号就可被转换成相应的表达上调或下调的基因。可用短链寡核苷酸(15~25 个核苷酸)、长链寡核苷酸(50~120 个核苷酸)或聚合酶链反应(PCR)扩增的 cDNA(100~3 000 碱基对)制备 DNA 芯片。在一固相载体上应用影印石版术进行原位寡核苷酸合成, 核苷酸相邻排列可达 20 个碱基, 从而组成芯片。也可以将长链寡核苷酸和 cDNA 直接点样在玻璃载玻片上。采用机械臂金属针, 可在一张玻璃载玻片上点样 10 000~30 000 次。

1.2 蛋白质芯片和肽芯片 只要建立合适的对照系统, DNA 芯片就可以对样本中存在的 RNA 或 DNA 进行检测并生成相应的信息。但是, 它并不能对基因翻译产物进行分析, 而要对基因翻译产物进行分析就需要建立多肽类的芯片。许多药物

靶点就是蛋白质, 因而蛋白质芯片和肽芯片的建立对于新药的开发有着深远的影响。由于技术上的困难, 时至今日, 这类芯片并未得到充分的应用。其中一个大的困难就是在制作蛋白质芯片时要保证其功能性的完整, 如翻译后的修饰和磷酸化作用。蛋白质芯片技术发展的另一重要方面在于检测方法的选择。现今采用的检测方法包括应用酶联免疫吸附测定原理, 使用酶标记物、荧光标记物进行芯片的标记, 或使用常用的蛋白质标记物来标记芯片, 这些检测方法都有一定的局限性。其他蛋白质芯片检测方法包括 MS 分析和细胞质基因组表面共振技术^[3]。

1.3 碳水化合物芯片 尽管肽芯片能够传递越来越多的信息, 但现今所采用的芯片并未涉及到翻译后的修饰问题。许多蛋白质和生物分子通过共价结合被糖基所修饰, 这种糖基被称为聚糖。许多生物过程包括糖-受体结合以及基因芯片成为研究这种相互作用的重要工具。将新糖脂点样于真离子镀膜的硝化纤维素膜上, 制作成一种碳水化合物芯片^[4]。用已知的可以与碳水化合物特异性结合的蛋白质作为新糖脂的探针, 来检测蛋白质-寡糖间的相互作用。另一种方法可以通过识别细胞表面表达的特异性聚糖来鉴定病原微生物^[5]。将聚糖点样于硝化纤维素膜表面, 用抗体作为探针来明确聚糖来源的病原微生物, 应用结果较为满意, 抗体可以检测出特异性的聚糖。这表明采用该技术, 有可能从临床血液样本中检测出特异性的致病原。

1.4 组织芯片和细胞芯片 基因表达水平或蛋白表达水平分析, 仅能提供相关基因的生物功能信息, 其潜在的临床应用信息以及作为药物靶点的信息。功能基因组学则可以对芯片筛选出的药物靶点进行验证。1998 年, Kononen 和 Kallioiniemi 建立了组织芯片(TMA)技术, 借此可以将感兴趣的组织样本放置在一张载玻片上。将分子靶点(DNA、RNA 或蛋白质)作为探针, 应用免疫组织化学、荧光原位杂交或其他分子检测技术来分析 TMA^[6-7], 从而能够对于成百上千个组织样本中的特异性分子靶点进行高通量的原位分析。

1.5 芯片实验室 芯片实验室(lab-on-a-chip, LOC)是一个跨学科的新研究领域, 是基于微电子机械系统技术研究发展起来的一种全新微生化分析系统^[8-9], 国外也称之为微全分析系统。它是通过微细加工和微电子技术在固体芯片表面构建微型生物化学分析单元和系统, 以实现蛋白质、核酸、无机离子, 以及其他生化组分的准确、快速检测。从本质上讲, 芯片实验室就是一种微型化的生化分析仪, 芯片实验室技术就是要把生物和化学等领域所涉及的样品制备、生化反应、分离检测等基本

操作步骤集成在一块数平方厘米的微芯片上,并对其产物进行分析的一种技术。因此,芯片实验室技术已被认为是 21 世纪最为重要的生化分析前沿技术之一^[10-11]。芯片实验室技术的潜在应用范围包括基因测序、临床分析、药物筛选以及生物战争试剂检测等。

2 生物芯片在消化道肿瘤中的应用

2.1 生物芯片在食管癌中的应用

食管癌的诊断一直依赖细胞形态学检查,主观判断的差别造成诊断水平的巨大差异,既影响疾病的早期诊断,更无助于判断化疗效果及疾病预后。基因芯片技术通过大批量基因筛选,有望建立基于基因表达水平的客观量化指标,某些研究已取得了初步的成果。

基因芯片技术在判断食管肿瘤预后、考察化疗效果等方面也显示出客观、高效、准确的优势。根据芯片杂交的结果分析,制订了基于不同基因表达水平的化疗反应性积分,并指出基因化疗敏感性积分与患者的预后具有显著相关性。故认为基因芯片技术在判断不同患者辅助化疗和预后方面存在着巨大的应用潜力。

2.2 基因芯片与胃癌临床研究

早期由于受密度所限,发现表达异常的基因较少。随着芯片技术不断提高,检测的结果更具有说服力和指导意义。

胃癌的形成很大程度上是染色体水平基因改变的积累结果。Weiss 等采用全基因系列的 CGH 芯片,确定基因组染色体的异常拷贝数,35 例胃癌患者均有染色体异常,其每例平均异常数为 16.0,染色体异常总和与扩增数目显著相关。Hierarchical 分级分析发现有 204 条基因在 3 簇之间有显著意义。3 簇不同基因表达谱间的淋巴结状况有显著相关性。Kaplan-Meier 生存分析显示,第 3 簇的胃癌比第 1、2 簇有更好的预后。因此,通过检查胃癌的染色体拷贝数异常,能够预测淋巴结状况和生存率。

2.3 生物芯片在结肠癌中的应用

结直肠癌、结肠息肉肉病等组织的基因改变,一直受到学者们的关注。然而,基因芯片技术的诞生第一次使得同时观察整体基因表达谱的改变成为可能。通过基因芯片技术对结直肠癌基因表达谱的筛选,可以发现若干与癌发生、发展有关的基因表达变化,将这些特异性表达变化的基因序列重新排列用于结直肠癌的诊断,理论上是可行的。

基因芯片技术还用于观察环境和药物对结肠上皮或癌组织基因表达的影响,对于药物作用机制研究及新药的开发有所帮助。总之,基因芯片技术才刚刚渗入消化领域的研究,就已经显示了巨大的潜力和广阔的应用前景。这一新技术的介入,将对消化系统疾病的发病机制、早期诊断、预后判断、病原微生物的致病基础、致病机制、毒力及耐药特征、药物作用机制、新药的开发利用以及临床干预措施效果判断等领域的研究产生深远的影响。

2.4 生物芯片在肝脏肿瘤中的应用

肝脏是机体能量来源、物质代谢和解毒等生化反应的枢纽。肝细胞癌(HCC)也是消化道肿瘤中发病率较高及恶性程度和危害程度最严重的肿瘤之一。基因表达谱的变化也是这些病变的遗传学基础。肝脏也是基因芯片技术应用相当活跃的领域,目前主要集中在对 HCC 的基因表达改变、机体能量障碍时肝脏细胞基因表达谱的改变、化疗药物疗效、毒性化学物质的作用及不同肝炎病毒对肝细胞基因表达水平的影响等方面的研究。

上述研究展示了生物芯片技术在肝病发病机制、肝炎病毒的致病机制、肝病诊断、疗效评估、预后判断、药物作用及毒理

学研究方面的应用前景。

2.5 生物芯片在胰腺癌中的应用

胰腺癌为多基因变异疾病,如何在复杂的基因中筛选出有价值的功能基因是目前胰腺癌研究的重点。无疑生物芯片已在高效筛选胰腺癌相关基因与新基因的发现中发挥了很重要的作用。

基因芯片为胰腺癌的诊断提供了一个新的方向。由于胰腺癌与正常组织相比具有肿瘤特异的基因表达谱,通过检测体内大量基因的变化水平,可以协助肿瘤的诊断。将芯片技术与激光捕获微切割技术相结合,可以特异性检测胰腺癌组织中正常导管上皮及肿瘤细胞的基因表达谱。

胰腺癌早期切除率低,化疗为重要的辅助治疗,然而目前胰腺癌辅助治疗的总体疗效仍不理想。胰腺癌对化疗不敏感是一系列因素作用的结果,涉及到肿瘤的生长、凋亡、损伤的修复,这些因素共同作用导致胰腺癌对化疗耐受。利用高通量分析的基因芯片工具研究胰腺癌化疗耐药的分子机制,为将来选择治疗方案、进一步生产更为敏感的药物或通过基因治疗缓解耐药提供理论基础。

3 芯片技术的发展前景

三种内在相关的技术很有可能在将来应用于芯片分析,并可能产生出一种“芯片实验室”(total lab-on-a-chip, TLOC)系统。

3.1 微流体技术(microfluidics)

微流体装置(microfluidic device, MFD)技术,主要应用于移动小体积的液体或气体,属于分析科学的动力学分支学科,具有应用于生物学分析的巨大潜力^[12-13]。芯片技术与微流体装置结合应用,会产生一种特殊的微型多功能分析系统,微流体装置不是仅仅取代芯片,而是与之相融合,产生出一种集成分子微流体芯片,可以完成某一方向的一系列研究工作。现在, MFD 的构造可以达到在微米或亚微米水平上建立微孔质结构或通道。

3.2 分子印刷技术(molecular imprintation)

分子印刷技术就是将分子进行精细的铺层。许多分析系统都用到了此项技术,但主要应用在压-电技术中,如石英晶体共振传感器或表面细胞质基因组共振分析。这些技术在生物流体、环境监测、基因定量和蛋白质组学表达谱中应用广泛^[14]。应用分子印刷技术的最终目标是产生一种合成生物催化剂,用于基因工程反应;亲和配体,用于流体系统,如 MFD 和生物传感器。

3.3 毫微秒技术(nanotechnology)

毫微秒技术可以在毫微秒水平上设计化学合成反应和工程构造,其应用与 MFD 以及分子印刷技术的最终目标相近。毫微秒技术可以包含原子印刷技术,而且可能被用于构建毫微秒流体装置、视觉及电子传感器,当然还可用于 TLOC 装置。作为 TLOC 装置的组成部分毫微秒技术还可用于显微层面上的固相合成反应^[15],或用于基因工程和构建毫微秒试管、毫微秒循环以及一些分子-离子-选择电极。当然,毫微秒技术现在和将来都会应用于特殊肽芯片的制作,主要是其表面构形和表面工程方面,从而服务于蛋白质组学芯片。

DNA 芯片、蛋白质芯片、碳水化合物芯片以及细胞芯片都将继续朝着共同的方向发展——从有限的少量样本中获得尽可能多的信息。新技术的不断涌现,必将改善芯片的设计,以提高其分析速度,并进一步减少所需样本量。

参考文献

[1] Lin B, Wang Z, Vora G, et al. Broad-spectrum respiratory tract pathogen identification using (下转第 896 页)

者的捐献过程,直至消除顾虑同意采集为止。采集前口服葡萄糖酸钙,预防枸橼酸钠不良反应。采集时,对血管的选择非常重要,一针率尽可能达到 100%,穿刺的成功与否是保留献血者的重要因素。注意与献血者的交流,介绍血小板的相关知识,简单讲解血细胞分离机的工作原理,重点是安全可靠的性能,解答献血者的疑问,介绍还输时会有轻微的不适,就像打吊瓶输液一样有种肿胀的感觉,消除其紧张心理^[2]。

2.2.4 采后服务 献血者捐献完成后,告知按压注意事项。给予口服饮料,助其循环血量及血糖的恢复,告知献血者献血后注意事项等内容。填写好献血证,让献血者在休息室休息 30 min 或无不适后方可离开,做到“走时有人送”。

3 延伸献血后服务

3.1 献血后回访 (1)对待所有捐献成分者和体检者,依照规程 3 d 之内必须做好回访和反馈工作。遇有特殊的不良反应,要做再次、多次的回访工作,必要时登门慰问献血者,直至无任何不适为止。(2)对初次捐献者进行重点回访,了解献血者的身体状况和献血后的心理感受,并进一步询问是否愿意再次捐献成分血,做好登记和统计工作。

3.2 建立激励措施 (1)通过短信平台或寄贺卡的形式,让献血者感受到血站的人性化服务。(2)定期举办机采献血者代表座谈会或外出旅游的形式等一些激励措施,鼓励其积极献血并可带动身边的人加入成分献血者队伍。

3.3 献血后的健康教育 对于检测不合格或有献血反应的献血者,通过电话、发短信、媒体等形式给予献血者提供心理帮助和健康指南,给予健康教育和生活指导,倡导献血者健康的

生活方式,增进血站和献血者之间的互信度。

4 结 果

2009~2010 年机采血小板的招募和采集情况见表 1。

表 1 2009~2010 年机采血小板的招募和采集情况

年度	机采招募人次	实际捐献人次	初次捐献人次	初次捐献比例
2009	2 787	1 867	612	32.7%
2010	3 450	2 111	841	39.8%

5 讨 论

通过细致入微地做好宣传招募和献血服务工作,本站的固定机采队伍逐渐壮大,招募新的献血者人数逐渐增加,首次捐献血者以 30% 以上的速度增长。同时,在实际工作当中,为了满足固定献血者的献血愿望,适当控制了初次捐献者的人数,固定的反复献血者达 60% 以上,完全可以满足临床成分用血的需求。

参考文献

[1] 马庆庆. 机采献血者招募与保留是安全输血的重要环节[J]. 中国公共卫生管理, 2008, 24(6): 627-628.

[2] 李笑春. 护理程序在机采血小板中的应用[J]. 实用临床医学, 2008, 9(12): 121.

(收稿日期: 2011-09-23)

(上接第 851 页)

resequencing DNA microarrays[J]. Genome Res, 2006, 16(2): 527-535.

[2] Malanoski A, Lin B, Stenger D, et al. Automated identification of multiple micro-organisms from resequencing DNA microarrays[J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34(5): 5300-5311.

[3] Belosludtsev Y, Bowerman D, Luebke K, et al. Organism identification using a genome sequence-independent universal microarray probe set[J]. Bio Techniques, 2004, 37(8): 654-660.

[4] Palacios G, Quan P-I, Jabado O, et al. Panmicrobial oligonucleotide array for diagnosis of infectious diseases[J]. Emerg Infect Dis, 2007, 13(6): 73-81.

[5] Quan PI, Palacios G, Jabado O, et al. Detection of respiratory viruses and subtype identification of influenza A viruses by Greene Chip Resp oligonucleotide microarray [J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(7): 2359-2364.

[6] Gardner S, Jaing C, McLoughlin K, et al. A microbial detection array (MDA) for viral and bacterial detection [J]. BMC Genomics, 2010, 11(3): 668-670.

[7] Kooperberg C, Fazio T, Delrow J, et al. Improved background correction for spotted DNA microarrays[J]. J Comput Biol, 2009, 9(8): 55-66.

[8] Victoria J, Wang C, Jones M, et al. Viral nucleic acids in live-attenuated vaccines: detection of minority variants and an adventitious virus[J]. J Virol, 2010, 84(9): 6033-

6040.

[9] Bolstad B, Irizarry R, Astrand M, et al. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias[J]. Bioinformatics, 2009, 19(3): 185-193.

[10] SantaLucia J, Hicks D. The thermodynamics of DNA structural motifs[J]. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2004, 33(10): 415-440.

[11] Zhang L, Miles M, Aldape K. A model of molecular interactions on short oligonucleotide microarrays[J]. Nat Biotechnol, 2009, 21(6): 818-821.

[12] Allred A, Wu G, Wulan T, et al. VIPR: a probabilistic algorithm for analysis of microbial detection microarrays [J]. BMC Bioinformatics, 2010, 11(8): 384-387.

[13] Ratushna V, Weller J, Gibas C. Secondary structure in the target as a confounding factor in synthetic oligomer microarray design[J]. BMC Genomics, 2008, 6(7): 31-35.

[14] Watson M, Dukes J, Abu-Median AB, et al. DetectiV: visualization, normalization and significance testing for pathogen-detection microarray data [J]. Genome Biol, 2007, 8(1): 190-193.

[15] Dodd L, Korn E, McShane L, et al. Correcting log ratios for signal saturation in cDNA microarrays[J]. Bioinformatics, 2004, 20(5): 2685-2693.

(收稿日期: 2011-10-17)