

文章编号: 1007-4627(2008)01-0077-05

基因芯片技术及其在放射治疗中的应用*

胡凯骞^{1,2}, 党秉荣¹, 邴涛¹, 李文建¹, 王菊芳¹

(1 中国科学院近代物理研究所, 甘肃 兰州 730000;

2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 基因芯片技术是建立在杂交序列基本理论上的分子生物学技术, 它以一种全面、综合和系统的思维方式研究生命现象。基因芯片技术可以完整地研究整个细胞或器官全部基因变化, 可以通过基因分析发现对电离辐射的基因反应差异, 从而建立一种新的分子放射生物学方法。综述了基因芯片技术及应用领域, 重点介绍了基因芯片技术在辐射治疗癌症中的应用。概述了重离子治疗肿瘤优于其它射线的原因。展望了利用基因芯片技术的优势探索肿瘤经重离子辐照前、中、后期的生物学效应。

关键词: 基因芯片; 放射治疗; 重离子

中图分类号: R815 **文献标识码:** A

1 引言

恶性肿瘤(癌症)是对人类生命健康危害极大的疾病, 全世界的科学家采用了各种治疗方法, 如外科手术、化学治疗、免疫治疗和放射治疗等来解决这一棘手的问题(见图 1^[1])。

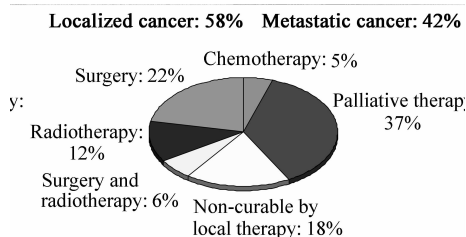


图 1 各种治疗肿瘤的方法

放射治疗是治疗恶性肿瘤的重要手段之一。电离辐射能通过引起各种细胞的 DNA 断裂抑制细胞的增生。当细胞吸收任何形式的辐射能量后, 射线都可能直接与细胞内的构成部分发生作用, 直接或间接地损伤细胞 DNA, 导致细胞死亡。近年来, 随着科技的发展, 放疗在肿瘤治疗中的地位愈显重要。大约 60%—70% 的肿瘤患者在病程的不同时期因不同的目的需要接受放射治疗。放射治疗作为根

治方法已在一些肿瘤治疗中获得成效, 如皮肤癌、鼻咽癌、精原细胞瘤等的治疗。但由于细胞的自我防御机制, 一些恶性肿瘤细胞可以逃避射线杀伤并产生辐射抗性, 严重影响肿瘤的放疗效果。所以目前依然不能达到较高和满意的治愈率。基因芯片技术作为一个能够对组织内基因表达进行研究的高通量和高效率的技术平台, 随着自身技术的完善以及生物信息学的进展, 在肿瘤的检测、诊断、治疗、预后和分类等方面的应用越来越广泛。与目前的放疗技术相结合将会开辟肿瘤治疗研究的新途径。

2 基因芯片技术的介绍

基因芯片技术是以 20 世纪 70 年代的 Southern 印迹法杂交技术为基础。最早的设想是由俄罗斯科学院恩格尔哈得分子生物学研究所和美国阿贡国家实验室的科学家提出的, 其原理是利用杂交法测定核酸序列。与此同时, 英国牛津大学生化系的 Southern 等也取得了在载体固定寡核苷酸及杂交测序的国际专利。1994 年, 用于检测地中海贫血症病人血样基因突变的第一个基因芯片诞生^[2]。随后基因芯片的制造技术迅速发展并不断完善, 一些商业化的

* 收稿日期: 2007-05-21; 修改日期: 2007-07-04

* 基金项目: 中国科学院西部之光人才培养计划资助项目(O406020XB0); 甘肃青年科学基金资助项目

作者简介: 胡凯骞(1982—), 男(汉族), 甘肃兰州人, 硕士生, 从事重离子辐射生物学研究;

E-mail: huxiangkai05@mails.gucas.ac.cn

基因芯片产品也逐步投入实际使用。

基因芯片技术通过把巨大数量的寡核苷酸、肽核苷酸或 cDNA 固定在一块面积很小的硅片、玻片或尼龙膜上而构成基因芯片。根据 DNA 序列片段的种类, 基因芯片大致可以分为寡核苷酸芯片和 cDNA 芯片。而按照制造工艺, 基因芯片大致可以分为原位合成和点样法两种^[3]。基因芯片的工作原理与 Southern 和 Northern 是一致的, 都是利用已知核酸序列作为探针与互补的靶核苷酸序列杂交, 通过获得杂交信号对被检测靶基因进行定性和定量分析。但基因芯片与传统方法的区别在于, 基因芯片将大量的探针集成于一张微小的基片表面, 从而能在同一时间对成千上万的大量基因进行平行分析, 从而获取大量的生物信息^[4]。图 2 给出了基因芯片杂交结果分析图, 纵横两轴代表两种样品的荧光信号强度 I , 图中的每一个点代表一段基因杂交信号序列。由图得出, 在芯片上 5 705 个基因中, 有 40 个基因的表达有明显差异^[5]。

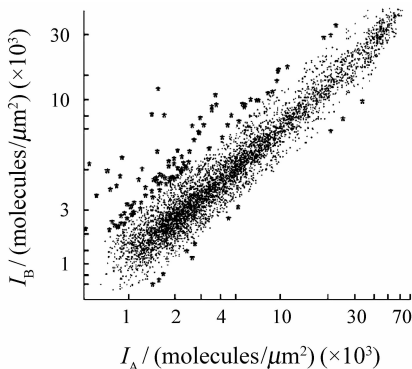


图 2 杂交信号强度数据散点图

目前, 基因芯片技术的应用领域主要有: 基因表达谱分析、DNA 测序、新基因的发现、基因多态性检验、基因组文库作图、单碱基多态性、疾病的诊断和分型、药物筛选、基因突变及肿瘤相关基因的测定等。

3 与辐射相关的基因芯片技术

在 20 世纪 80 年代, 有人猜测哺乳类细胞缺乏明显的电离辐射导致 DNA 损伤的应激基因反应, 虽然当时已经发现酵母菌有约 1% 的辐射反应基因^[6]。后来陆续发现, 电离辐射和其他 DNA 损伤因子可以引起许多哺乳类细胞中多达数百种基因变化, 其中有一些可能是特异性对辐射损伤反应(如

一些 DNA 损伤修复基因和机体内隐伏病毒基因激活等), 更多的则是电离辐射触发许多非特异性损伤的“共同通路”反应基因, 如生长因子、细胞周期蛋白和许多原癌基因的活动等。研究还发现, 对电离辐射的基因反应是变化多端的, 来源于不同组织的细胞株、同一组织来源而性状不一的细胞株, 其基因辐射反应各异。虽然可能存在许多信号反应通路被电离辐射所激活, 但 $p53$ 仍是目前倍受关注的一个焦点。 $p53$ 基因产物是调节细胞周期和细胞凋亡的重要因子。致突变因子引起的 DNA 损伤, 能迅速诱导 $p53$ 产物的积累, $p53$ 产物将细胞周期阻滞于 G_1 期, 并结合增值细胞抗原(PCNA)而抑制 DNA 复制, 使被损伤的 DNA 在复制之前有修复的时间。如果损伤得不到修复, $p53$ 还可以引起细胞凋亡, 清除带有突变的细胞。如果 $p53$ 基因发生突变, 突变的 $p53$ 产物则丧失了诱导细胞周期阻滞的能力, 导致细胞基因组的不稳定性。在不同人类肿瘤细胞株受照后的基因反应中, ATF3 和 FRA1 因其与 $p53$ 的特殊关系尤受关注, 继续应用 $p53$ 野生型株以及裸鼠实验, 证实了这两个基因的确受 $p53$ 调控, 同样的方法也证实其他受 $p53$ 调控的基因存在, 例如 MDm2 等^[7]。随着基因芯片技术的不断完善, 利用基因芯片技术可以完整地研究整个细胞或器官全部基因变化, 可以通过基因分析发现对电离辐射的基因反应差异, 从而建立一种新的分子放射生物学方法。应用该技术已经初步发现一些新的辐射反应基因活动, 对肿瘤治疗具有重要意义。

4 基因芯片在放射治疗中的应用

4.1 基因芯片对癌症的诊断^[8]

(1) 确定病变组织基因表达的特殊序列模式, 探测患病细胞相对正常细胞基因表达水平的差别: 张恒等^[9]采用含有 588 个肿瘤相关基因的 cDNA 芯片表达分析滤膜, 检测肺鳞癌和癌旁组织的基因表达, 结果共有 26 个基因表达差异, 其中肿瘤坏死因子受体等 16 个基因表达上调, IL-13 前体等 8 个基因下调。分析基因表达水平的差别十分显著。

(2) 检出与人类疾病有关或癌症发展中受影响的基因突变点。美国 Af2fimetrix 公司设计出商品化的 CYP2D6 和 CYP2C19 多态性检测芯片, 它们可以检测出 CYP2D6: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 和 11 突变位点及 CYP2C19 的 2 和 3 型突变位点^[10]。

(3) 基因芯片技术可以进行肿瘤分型。肿瘤的发生和发展常伴随着基因表达的改变, 正常人与肿瘤患者、相同肿瘤的不同亚型患者的基因表达之间存在相关和不同, 基因芯片技术可以帮助人们分析同种肿瘤基因突变的不同点和相同点, 分析肿瘤患者自身的免疫差异, 辐射敏感性的差异。例如, Fuller 等^[11]以 Atlas 基因芯片从 24 例不同级别脑胶质瘤新鲜组织中筛选特异表达基因, 发现 IGFBP2 在 GBM 中过表达, 而在低级别的脑胶质瘤中低表达或不表达, 为胶质瘤的分型提供了分子生物学依据。HPV 感染在宫颈癌的发病中占重要作用, 几种 HPV 类型 (如 HPV16 和 HPV18) 与宫颈癌密切联系, 利用 HPV 芯片对其进行筛查有很大的应用价值。Cho 等^[12]用新设计的具有 22 探针的 HPV 芯片检测 685 例宫颈阴道拭子的 HPV 基因型, 并与巴氏诊断法比较。结果发现, 对照组有 31.9% 发现 HPV, 病变组为 78.6%。主要的 HPV 基因型为 16 型、58 型、18 型 (依次递减), 它们为宫颈癌的主要致病因素。认为 HPV 芯片有作为一种高通量的筛查试验的可能。

4.2 肿瘤辐照后相关基因的测定

基因芯片目前已被应用到电离辐射领域。电离辐射除了诱导核内 DNA 损伤, 也可诱导一些分子表达, 激活信号途径。辐射诱导细胞信号转导途径的激活将改变细胞的基因表达谱, 通过基因芯片可以了解辐射诱导基因在调节细胞周期、细胞凋亡和 DNA 修复中的作用^[13]。采用基因芯片对基因表达进行分析, 可随时获取肿瘤细胞生长各期与肿瘤生长相关基因的表达模式, 对不同肿瘤的发生、发展有一个系统和深入的阐述分析^[14]。

例如, Amundson 等^[15]以烷化剂 (MMS) 和紫外线作用于野生型和变异型 *p53* 肿瘤细胞系, DNA 芯片检测发现不同细胞系、同一细胞系不同 *p53* 表型和同一细胞系同一 *p53* 表型但接受不同应激因素, 其基因表达谱都不相同。部分基因应答为 *p53* 表型依赖, 另一些则不依赖。采用基因芯片技术研究^[5] 16 Gy ⁶⁰Co γ 射线照射前后 PC12 细胞基因的表达变化时对辐射相关基因的筛查, 表明有 40 个差异表达基因, 其中上调基因 37 个, 下调基因 3 个。这些差异基因主要涉及细胞周期、代谢、信号转导、免疫与应激、细胞增殖、生长发育及细胞凋亡等多

个方面。RT-PCR 结果显示, 照射后 48 h PC12 细胞 OAS1, GARG16 和 IL6 mRNA 表达水平均上调, 与芯片结果一致。张萍等^[16]对食管鳞状细胞癌细胞株 TE13 经反复 7 次射线照射 (累积剂量 120 Gy), 并应用基因芯片技术分析放射抗拒性食管癌细胞基因表达变化, 逐步筛选出具有辐射抗性的细胞 TE13RI20。验证了 TE13 和 TE13RI20 两种细胞的不同放射敏感性。利用流式细胞术检测它们的细胞周期分布特征, 用基因芯片分析了两种细胞基因表达差异。结果表明, TE13RI20 的细胞群体倍增时间为 39.93 h, 长于亲代 TE13 (33.94 h)。TE13 及 TE13RI20 的放射敏感性明显不同。TE13RI20 与 TE13 相比, 上调基因 96 个, 下调基因 80 个, 其中原癌基因和抑癌基因上调 17 个、下调 7 个, 细胞凋亡相关基因上调 12 个、下调 8 个, DNA 结合转录相关基因上调 40 个、下调 41 个, 蛋白翻译合成相关基因上调 27 个、下调 24 个。与亲本 TE13 相比, TE13RI20 在基因水平上发生明显改变。

4.3 利用基因芯片寻找辐射抗性基因

为提高放射治癌效果, 增加肿瘤细胞的辐射敏感性, 可以利用基因芯片技术寻找肿瘤辐射抗性相关的一些基因, 建立一种筛选这些基因的方法。郭万峰等^[13]对肺癌的研究表明, 过表达的 MDM2 可以通过抑制 *p53* 所调节的细胞凋亡而降低放射治疗的效果。抗 MDM2 分子的反义寡核苷酸可以降低 MDM2 的表达, 增加人肿瘤细胞的辐射敏感性。研究中发现, 一些参与细胞增殖的基因, 如 MDM2, Bcl2, PKC ζ 和 PIM2, 在肺癌细胞中照射后表达水平明显增加, 而在 NCI2H446 细胞中降低; 一些参与 DNA 修复的基因, 如 XRCC5, ERCC5, ERCC1, ERCC4, RAD9A 和 DNA2PK, 在肺癌细胞中的表达水平比在正常细胞中高。这些基因可能参与了肺癌细胞辐射抗性的形成, 是细胞致敏的潜在靶点。郭万峰等^[13]设计了一种寡核苷酸微阵列来分析两种辐射敏感度不同的肺癌细胞株 2NCI2H446 和 A549 在化疗后的基因变化。结果显示, MDM2, Bcl2, PKC ζ 和 PIM2 基因表达水平在 A549 细胞中上调, 而在 NCI2H446 细胞中下调; A549 细胞中 DNA 修复基因如 XRCC5, ERCC5, ERCC1, RAD9A 和 ERCC4 表达水平程度比 NCI2H446 细胞高得多。这一系列基因表达变化的发现对试图增加放疗耐受肺

癌细胞的辐射敏感性有很大的帮助。

可以发现,一些参与细胞 DNA 修复、细胞周期调控、细胞增殖和抗凋亡作用的基因可能有助于癌细胞辐射抗性的形成。因此利用基因芯片技术寻找这些抗辐射基因作为靶点,加入辅助性的药物,增加肿瘤细胞的辐射敏感性,从而达到更好消灭肿瘤的效果。有研究表明^[17]EGFR 抗体和射线联合应用对肿瘤的杀伤效果比任何单独处理都更好,所以靶向性离子疗法将是放射治疗发展的新方向。

5 基因芯片技术在重离子辐射中的初步应用

由于重离子 Bragg 峰的物理特性,使重离子束治疗肿瘤成为当今最先进的放疗技术,即把受照射的肿瘤部位置于 Bragg 峰处,从而在肿瘤接受较大剂量情况下,其前方正常组织接受较小的剂量^[18]。X 射线、 γ 射线、电子及中子等辐射的剂量并非局域沉积,它们的疗效和适应症受到很大限制,并造成不少并发症。为此,要求所用射线和技术必须能将剂量集中在肿瘤上,而周围健康组织受损很小。根据重离子在物理学和生物学上的特性,重离子是最能满足上述要求的。重离子技术作为放疗的新技术已得到广泛运用,并取得了一些可喜的成绩。

以重离子技术为基础,结合基因芯片技术将成为治疗癌症的新趋势。依据基因芯片应用的可行性,针对辐射诱导的生物学效应,人们可以构建与辐射相关的寡核苷酸基因芯片排除干扰因素,进行生物信息学分析:包括辐射引起的 DNA 损伤和修复、辐射诱导的染色体畸变、辐射诱导的细胞周期效应、辐射肿瘤细胞后生物学变化、辐射癌症的临床应用等;利用基因芯片技术分析不同肿瘤细胞的基因表达、多态性检验、突变和疾病的诊断等。Oohira 等^[19]利用腺病毒载体构建野生型 $p53$ 表达质粒,结合重离子技术,用基因芯片相关技术研究单独使用 $p53$ 基因或者重离子辐射治疗或联合使用对食道癌鳞状细胞(SCC)的生长阻滞和凋亡的作用影响。发现 $p53$ 基因可增强肿瘤细胞对重离子辐射的敏感性。 $p53$ 基因和重离子辐照联合使用比单用其中之一,具有更显著的肿瘤抑制作用。目前,我们选用肝癌细胞 SMMC-7721 和正常肝细胞 HL-7702 检测染色体末端(端粒)及其他一些相关基因的变化,并与西北工业大学生命科学院合作实验,

选用人胚胎皮肤成纤维细胞 CCC-ESF-1 和人胚胎肝正常细胞 CCC-HEL-1 作为对照,利用基因芯片技术检测某些抑癌基因的变化和基因组的变化。两项实验正在同时进行,将对基因芯片结合重离子辐射的新技术提供有力的基础数据。

6 展望

重离子与基因芯片技术相结合将成为离子治疗模式的新途径,这也将是一项长期而艰巨的任务。随着技术的不断提高,利用基因芯片技术进行前期预测、中期辐照、后期跟踪的治疗计划将成为可能。

(1) 在前期利用基因芯片技术可以对肿瘤作出精确诊断,进行肿瘤分型,为不同的患者实施个体化的重离子治疗提供依据。

(2) 在辐照阶段,可应用基因芯片技术观察不同强度的重离子照射对不同的肿瘤(或不同的肿瘤亚型)的治疗反应和代谢调制作用,研究经重离子照射时肿瘤细胞的基因变化。所以可以利用基因表达谱的不同和基因受重离子的影响变化进一步确定重离子治癌的手段和方法。此阶段工作量巨大,而基因芯片技术的应用使其系统研究成为可能。

(3) 在后期,跟踪分析与正常组织基因的比较以及重离子治疗后肿瘤细胞的生物学变化。分析能否在重离子照射的一定强度下和导致 DNA 损伤的同时,激活 $p53$ 的凋亡通道,引起细胞周期阻滞和细胞凋亡;或者激活个体的自身免疫系统来杀死肿瘤;或退变、分化成成熟的体细胞。

将基因芯片技术与重离子技术相结合,帮助人们从分子水平了解认识肿瘤的差异性,对患者进行有效的前期预测和后期跟踪,实施个体化的治疗方案,发挥二者的优势,有效地治疗肿瘤。现代治疗的经验告诉人们,缺乏靶向性的传统治疗手段,不能达到良好的抗肿瘤效果,因而靶向性抗肿瘤的疗法成为攻克肿瘤的新的发展方向。所以利用基因芯片技术寻找出肿瘤的抗辐射基因并将其作为靶点,利用药物、转基因手段、配体抗体原理增加肿瘤的辐射敏感性,达到有效治疗癌症的目的。同时也可进一步利用基因芯片技术结合相关技术研究肿瘤细胞辐照前后的生物学效应(包括应激条件下的基因变化、蛋白的抑制、激活及信号通路的抑制、激活等)。由此可见,基因芯片技术在辐射治疗中的应用,必将成为辐射治疗方面的革命性的新方法和新

工具。

参考文献 (References):

- [1] Debus J. GSI Nachrichten, 1998, **15**: 16.
- [2] Sun Chunpeng. Journal of Henan University (Medical Science), 2006, **25**(2): 62 (in Chinese).
(宋纯鹏. 河南大学学报(医学版), 2006, **25**(2): 62.)
- [3] Cai Yumei, Zhang Sujuan. Journal of North China Coal Medical College, 2005, **7**(1): 50 (in Chinese).
(蔡玉梅, 张素娟. 华北煤炭医学院学报, 2005, **7**(1): 50.)
- [4] Neelam Dhimana, Ruben Bonilla, Dennis O' Kane J, *et al.* Poland Vaccine, 2002, **20**: 22.
- [5] Gao Ronglian, Chen Xiaohua, Rao Yalan, *et al.* Chin J Radiol Med Prot, 2005, **25**(3): 242 (in Chinese).
(高荣莲, 陈肖华, 饶亚岚等. 中华放射医学与防护杂志, 2005, **25**(3): 242.)
- [6] Fomace Jr A J, Alamo I J, Hollander M C. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, **85**: 8 800.
- [7] Amundson S A, Bittner M, Chen Y D, *et al.* Oncogene, 1998, **17**: 3 287.
- [8] De Benedetti V M, Biglia N, Sisoni P, *et al.* Int J Bid Markers, 2000, **15**(1): 1.
- [9] Zhang Heng, Liu Zihua. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2001, **28**(3): 172 (in Chinese).
(张恒, 刘芝华. 中国肿瘤临床, 2001, **28**(3): 172.)
- [10] Li Jinheng, Chen Bin. Jouranl of Medical Postgraduates, 2005, **18**(1): 56 (in Chinese).
(李金恒, 陈冰. 医学研究生学报, 2005, **18**(1): 56.)
- [11] Fuller G N, Rhee C H, Hess K R, *et al.* Cancer Res, 1999, **59**(17): 4 228.
- [12] Cho N H, An H J, Jeong J K, *et al.* Am J Obstet Gynecol, 2003, **188**(1): 56.
- [13] Guo Wanfeng, Lin Ruxian, Huang Jian. Chin J Radiol Med Prot, 2005, **25**(2): 107 (in Chinese).
(郭万峰, 林汝仙, 黄坚. 中华放射医学与防护杂志, 2005, **25**(2): 107.)
- [14] Hu Die, Liao Jin. Journal of Capital University of Medical Sciences, 2004, **25**(1): 129 (in Chinese).
(胡蝶, 廖静. 首都医科大学学报, 2004, **25**(1): 129.)
- [15] Fornace A J, Amundson S A, Bittner M, *et al.* Gene expression, 1999, **7**(426): 387.
- [16] Zhang Ping, Zhou Zhiguo, Gao Xianshu, *et al.* Chin J Radiol Med Prot, 2006, **26**(6): 266 (in Chinese).
(张萍, 周志国, 高献书等. 中华放射医学与防护杂志, 2006, **26**(6): 266.)
- [17] Zhan Qimin. Molecular Oncology. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005, **12**: 262 (in Chinese).
(詹启敏. 分子肿瘤学. 北京: 人民卫生出版社, 2005, **12**: 262.)
- [18] Dang Binrong, Wei Zengquan, Li Wenjian. Foreign Medical (Sciences-section of Radiation Medicine and Nuclear Medicine), 2002, **26**(1): 33 (in Chinese).
(党秉荣, 卫增泉, 李文建. 国外医学(放射医学核医学分册), 2002, **26**(1): 33.)
- [19] Oohira G, Yamada S, Ochiai T, *et al.* Int J Oncol, 2004, **25**(3): 563.

Application of Gene Chip to Radiotherapy*

HU Kai-qian^{1,2,1)}, DANG Bing-rong¹, BING Tao¹, LI Wen-jian¹, WANG Ju-fang¹
(1 Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;
2 Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Gene chip technology is a molecular biology technique based on the theory of the hybridization sequencing, it has been applied in many biology fields. In this paper, a new therapy model which combined gene chip with radiotherapy is introduced. And it will be used as guideline in prophase, metaphase and anaphase of radiotherapy with heavy ion.

Key words: gene chip; radiotherapy; heavy ion

* **Received date:** 21 May 2007; **Revised date:** 4 Jul. 2007

* **Foundation item:** Western Light Talents Training Program of Chinese Academy of Sciences (O406020XB0); Youth Science and Technology Foundation of Gansu Province

1) E-mail: huxiangkai05@mails.gucas.ac.cn