

# Research and Application of Molecular Pathology in Diagnostics

Jiandong Han, Hongkang Wang, Jianmin Wang, Jiakuan Dong, Jie Zhang, Hao Zhou, Ting Yang, Eerdun\*

Inner Mongolia Medical University, Hohhot Inner Mongolia  
Email: \*523074081@163.com

Received: Feb. 23<sup>rd</sup>, 2019; accepted: Mar. 13<sup>th</sup>, 2019; published: Mar. 20<sup>th</sup>, 2019

## Abstract

Advances in molecular biology technology have provided new ideas for molecular diagnosis. Compared with traditional culture and phenotypic identification, molecular diagnostic technology has greatly shortened the time required for diagnosis, while improving sensitivity and specificity, and is easy to operate and easy to repeat. Molecular diagnostic methods mostly perform molecular identification of pathogenic fungi on the basis of culture. It is also reported that some molecular biology techniques can directly detect pathogens from liquid culture bottles and even clinical samples. With the continuous development of molecular biology theory and technology, molecular diagnostic techniques based on nucleic acids and proteins have begun to be gradually applied in clinical practice. The diagnostic techniques at the molecular level require short time, high specificity and sensitivity, and overcome to some extent. The defects of traditional diagnostic methods can achieve early and specific diagnosis of pathogenic bacteria, improve patient prognosis and improve patient survival rate. The nucleic acid isothermal amplification technology can complete the amplification of DNA or RNA at a certain temperature. Compared with the traditional PCR method, the nucleic acid isothermal amplification technology greatly simplifies the requirements of the instrument, and the constant temperature water bath can complete the reaction, and the time is also greatly shortened; it can meet the needs of simple and fast diagnosis. Loop-mediated isothermal amplification techniques design two pairs of primers for six independent fragments of the gene sequence to achieve specific amplification of the nucleic acid fragments.

## Keywords

Pathology, Diagnosis, Cancer

# 分子病理学在诊断学中的应用与研究

韩建冬, 王红康, 王建民, 董佳轩, 张杰, 周浩, 杨庭, 额尔敦\*

内蒙古医科大学, 内蒙古 呼和浩特

\*通讯作者。

Email: \*523074081@163.com

收稿日期: 2019年2月23日; 录用日期: 2019年3月13日; 发布日期: 2019年3月20日

## 摘要

分子生物学技术的进步为分子诊断提供了新的思路, 与传统的培养及表型鉴定相比, 分子诊断技术大大缩短了诊断所需时间, 同时提高了敏感性和特异性, 且操作简便、易于重复。分子诊断方法大多在培养的基础上进行病原真菌分子鉴定, 也有报道某些分子生物学技术可直接从液体培养瓶, 甚至临床样本中进行病原检测。随着分子生物学理论和技术的不断发展, 目前基于核酸和蛋白质的分子诊断技术已经开始逐步应用于临床, 分子水平的诊断技术需要的时间短、特异性和敏感性高, 在一定程度上克服了传统诊断方法的缺陷, 可以实现对病原菌的早期、特异诊断, 改善患者预后、提高患者生存率。核酸等温扩增技术能在一定温度下完成对DNA或RNA的扩增, 与传统PCR方法相比, 核酸等温扩增技术对仪器的要求极大地简化, 恒温水浴即可完成反应, 时间也大大地缩短, 能满足实现操作简单、快速诊断的需求。环介导等温扩增技术针对基因序列的六个独立片段设计两对引物, 实现对核酸片段的特异性扩增。

## 关键词

病理学, 诊断, 癌症

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

## 1. 引言

病理学是从病因, 发病机制, 形态变化及功能损害入手来研究疾病发生发展规律的学科。从器官病理学概念的提出(Margani, 1761)到《细胞病理学》一书的问世(Virchow, 1858), 至今已出版了数以千计的病理学专著和教科书。20世纪70年代初, 随着细胞生物学和分子生物学的发展, 病理学与上述学科相互渗透而形成了新的分支学科——分子病理学, 由于其在蛋白质和核酸等生物大分子水平上, 应用分子生物学理论, 技术及方法研究疾病发生发展的过程, 从而给传统病理学注入了生机。

分子病理学是一个快速发展的领域, 在肿瘤的临床管理以及新型抗癌药物的药物开发中占据中心地位。现在, 技术先进和成熟的微阵列平台可以通过不同的生物信息学工具进行评估, 这些工具能够识别与疾病发展相关的新基因和预测个体肿瘤临床结果的基因簇。蛋白质和复杂蛋白质裂解物的自动高度平行分析, 用于早期检测乳腺癌, 前列腺癌和卵巢癌等癌症, 作为血清中的蛋白质组学模式也出现在地平线上。此外, 通过抗体或反相蛋白质阵列对肿瘤样品的改进分析可能在未来为病理学家提供关于活化的致癌信号传导途径和其他细胞功能的信息, 例如药物反应或转移潜力。虽然表达微阵列和蛋白质组学分析依赖于与石蜡包埋的组织样品不相容的相对不稳定的材料, 但使用专门的高通量平台对DNA甲基化的研究已经揭示了在未来诊断中使用。因此, 可能需要结合不同生物学水平DNA, RNA和蛋白质的“多重方法”来对恶性肿瘤进行功能分类。人类肿瘤的标准诊断程序目前基于与临床数据密切相关的组织病理学和免疫组织学[1]。

到目前为止, 这些数据包含了关于患者预后的最相关信息, 并且是治疗设计的合理基础。由于肿瘤细胞形态的改变多样性并未完全反映肿瘤细胞的形态, 病理学家和临床医生经常观察到, 两个在看似“相同”的阶段中携带“相同”类型肿瘤的患者在生存方面表现出不同的临床结果, 特别是在治疗反应方面。为了改善这种不令人满意的情况, 基于病理学家的组织检查的患者特异性疾病预测将是非常有帮助的[2]。近年来, 已经公开了许多分子标记和标记, 其至少部分地预测了预后和治疗效果。考虑到细胞功能由功能活跃的信号传导途径的复杂网络控制的事实, 单个或少量蛋白质的表达分析不可能精确地预测个体肿瘤的临床结果。生长信号的自给自足, 对生长抑制信号的不敏感, 细胞凋亡的逃避, 无限的复制潜力, 持续的血管生成以及组织侵袭和转移。然而, 这些改变中的每一种都是通过信号转导, 基因或蛋白质表达, 蛋白质修饰和定位的不同修饰来实现的。因此, 需要与当前标准诊断相比恶性肿瘤的不同和改进的表征以反映恶性细胞典型的多种遗传, 蛋白质组和代谢组学改变。几种新开发的高通量技术, 如 DNA 微阵列, 蛋白质和抗体阵列, 蛋白质组技术, 如质谱, 代谢组学分析, 甲基化阵列, 反相蛋白质微阵列(RPA)等。通过这些技术整合到标准诊断程序中, 未来的分子病理学将能够显著提高基于组织的检查的相关性[3]。病理学将在治疗设计中发挥关键作用, 并通过提供分子诊断方法, 也在治疗调整和有效药物的选择中发挥作用。

## 2. 病理组织的培养

现在, 培养细胞和组织样品的基因表达谱的产生是一种成熟的方法。在大多数实验中, 使用了对活化玻璃表面上的单个基因特异的 DNA 片段。从待分析的生物材料制备 RNA, 逆转录成 cDNA, 用荧光染料标记, 并与阵列杂交。通过激光扫描仪检测杂交信号, 以各种方式对图像进行标准化, 并且将针对各个基因获得的相对表达水平进一步聚类成具有相似或相同表达模式的基因组。DNA 微阵列由数千个 DNA 元件自组织地连接到固体表面, 例如涂覆的载玻片, 硅或尼龙。DNA 序列是寡核苷酸或 cDNA, 代表不同的目的基因。每个基因通常由不止一个特征表示, 以增加分析的特异性。cDNA 克隆通常选自公共数据库, 从 cDNA 文库扩增, 并在点样前纯化。或者化学合成寡核苷酸并点样, 或者可以在阵列表面上直接合成寡核苷酸[4] [5] [6] [7]。除了代表已知基因的序列之外, 还可以在固体表面上发现代表编码未知功能基因的表达序列标签(EST)的序列, 提供研究新标记基因的潜力。靶 DNA 通常是源自肿瘤细胞 mRNA 的 cDNA, 其通过逆转录酶-聚合酶链反应(PCR)扩增并同时标记。RNA 由快速加工的细胞培养物或新鲜冷冻组织制备。目前正在测试新的固定技术和制备方法, 这也可能在将来允许使用由石蜡包埋组织制备的 RNA 用于多种微阵列实验。当然, 靶 DNA 也可以从基因组 DNA 片段制备[8] [9] [10]。对于标记, 现在使用荧光染料比较多。在靶 DNA 与固定化阵列 DNA 杂交后测定每个基因的表达强度。在每个斑点产生的杂交信号反映了相应基因的表达。使用特殊软件进行信号的量化, 该软件允许在阵列生产和杂交期间校正点完整性和技术偏差并解释信号强度。为此目的, 必须引入正常组织或任何其他参考 cDNA 的 cDNA。最终结果提供了遗传表达谱, 表明组织样品中每个基因的过表达, 低表达, 无变化或完全缺失, 以便相互比较。生物信息学不仅从每个高通量实验中获得的大量数据, 而且从数据文档, 数据解释中获得的大量数据是一个独特的挑战, 需要病理学家和生物信息学专家之间的密切合作。因此, 已经开发了用于提取复杂信息的方法和生物信息学工具, 通过统计方法的评估, 以及将分子信息转换成临床相关数据。今天的 cDNA 微阵列已被用于各种不同的目标。为了选择适合每项研究的统计分析方法, 区分不同类型的阵列分析是有帮助的[11]。

已经开发了几种数据分析和解释方法, 可以分为两类: 监督和非监督方法。监督方法意味着一些外部信息, 如肿瘤分级或患者的生存, 在分析之前定义相关的类别; 监督算法在训练样本集上建立模型, 其将基因集分配给预定义的肿瘤样本组。在训练了类预测算法之后, 它可以用于预测新样本的类别。为了评估错误率(例如, 错误分类的肿瘤的百分比), 经常使用交叉验证方法。在该方法中, 可用数据集被重复分成训练集和测试集[12]。然后在训练集上训练该算法并将其应用于测试集, 并计算正确和错误预测。

一种特殊类型的交叉验证是留一法策略，其中只有一个样本从训练集中省略。然后将该一个样品用作测试装置。该方法实现了最大的训练效率，但需要高计算资源[13]。这样的样品分类可以有助于鉴定区分具有存活率良好或不良的预定义患者组的基因组，例如雌激素受体 ER 阳性或 ER 阴性。已经描述了这种方法来区分例如不同实体肿瘤，急性髓性白血病和急性淋巴细胞白血病亚组，弥漫性大 B 细胞淋巴瘤，早期和最新卵巢癌之间的肿瘤实体。

### 3. 病理组织的培养

线性独立分量分析(ICA)提供了一种相对较新的无监督分析阵列数据的方法。与聚类分析方法(假设每个基因仅属于一个聚类)相反，ICA 基于组合控制的思想，从生物学角度来看更为可靠。基因表达水平被描述为常见隐藏变量的线性函数，其在(在理想情况下)与变异的不同生物学原因相关，例如转录调节因子或对治疗的反应。因此，基于 ICA 的结果显示出增加的生物相关性，并且可能描述先前未通过聚类方法检测到的新的生物学链接。美国国家癌症研究所对子宫内膜癌和良性子宫内膜样本进行了一项有趣的研究[14]，将 ICA 的功效与其他既定方法进行了比较，从而检测出良性和恶性组的改善分离，与组织学分类相对应的特征性表达模式，以及与核心相关基因相关的新模式。对于与子宫内膜癌临床相关的脂肪酸代谢。因此，通过高通量方法和复杂的生物信息学方法仔细检查组织病理学上充分表征的肿瘤材料甚至可能在这种先进的诊断方案中解开新的疾病机制。DNA 微阵列的应用高通量 cDNA 和寡核苷酸阵列技术的应用以及基因表达谱的建立已经在过去几年中彻底改变了实验性肿瘤诊断。通过使用这些工具，已经确定了无法区分的肿瘤亚组。此外，基因特征的发展使得预后得出结论无法使用标准的组织病理学和免疫组织化学方法得出，为通过诊断病理学进行更全面的肿瘤分析打开了大门。分子分类和预后根据包括数千名患者在内的数百项国际研究，建立了基于免疫组织化学支持的常规组织病理学的恶性肿瘤国际分类系统，即 UICC-TNM 系统。通常，TNM 系统有助于估计肿瘤组的预后。然而，当预测个体病例的预后时，这种传统组织病理学分析形态学参数的经典方法并不完全充分。因此，目前正在研究 DNA 微阵列技术以通过将阵列结果与肿瘤的组织形态学和临床行为相关联来改进当前的分类系统。Khan 等人进行了分子分类的第一步。他们定义了癌细胞系的表达特征，这些特征指示了器官的起源类型。一项具有里程碑意义的研究，包括基因表达谱，DNA 微阵列作为组织病理学分类的延伸，已经显示出区分 AML 和 ALL 的可能性，并提高预后预测的准确性。

具有相似组织学外观但具有不同临床行为的肿瘤，例如儿童期的小蓝圆肿瘤，难以在常规显微镜基础上分类。遗传分析证明可以正确识别四个亚组神经母细胞瘤，横纹肌肉瘤，Ewings 肉瘤和特殊类型的非霍奇金淋巴瘤，因此可以成为肿瘤分类的有价值的帮助。由于组织病理学评估的主观性，WHO 少突神经胶质瘤的分级系统受到一定限制。基因表达谱现在解开了两个分子不同的亚组，这些亚组对应于形态学分级，因此，可用于提供更客观的分级和预测预后的工具。这种方法可以扩展到其他脑肿瘤，其中可重复的组织学评估通常是困难的，如果不是不可能的话。在一组具有平衡临床病理特征的 55 名乳腺癌患者中，通过分析仅约 1,000 个候选基因的 mRNA 表达，可以鉴定出具有不同 5 年存活率的三个亚类肿瘤。在一项基于人群的研究中，Sotiriou 等人能够根据基因特征提出乳腺癌分类和预后的不同方面。侵袭性与侵袭性乳腺肿瘤分子分析揭示了遗传改变的广泛相似性，表明在早期阶段。早期乳腺癌治疗。已经描述了具有不同临床特征的肿瘤实体的进一步遗传分类，用于乳腺癌，皮肤恶性黑色素瘤，大 B 细胞淋巴瘤和 B 细胞淋巴瘤，儿科 ALL 和 MLL 易位的急性白血病，肺腺癌，卵巢，结肠和前列腺[15]。

### 4. 病理学的局限性

到目前为止，不可能准确地确定在诊断时未发生临床上可检测的转移的肿瘤是否会在随后的几年中

转移。然而, 该信息对于确定例如是否需要辅助治疗是至关重要的。这为患有辅助治疗的患者提供了合理的治疗原发性和隐匿性转移在临床实践中, 可能发生转移, 而原发肿瘤未知或不清楚某个转移是否来自自己知的原发性肿瘤。最常见的是, 组织病理学除了形态学免疫表型分析外, 还可以揭示组织来源。尽管如此, 基因表达谱可能对根据其来源组织对癌细胞进行分类有额外的帮助。结果表明, 原发性肿瘤分子特征在其转移灶中得以保留, 因此可以进行明确的分配, 为充分的治疗提供必要的信息。此外, 可以证明 DNA 阵列能够区分肺腺癌和肺外转移灶。未知原发性癌症的起源可以源自特征性表达模式。由于适应治疗干预的高效力, 恶性肿瘤细胞经常响应于放射或细胞抑制药物而发展逃逸机制。尽管已经进行了许多尝试, 但到目前为止, 还没有可靠且实用的技术来预测肿瘤对药物或辐射的反应。其原因是多种细胞机制, 例如 DNA 修复增加, 药物转运蛋白水平升高, 解毒酶过度表达, 以及通常参与耐药性发展的细胞凋亡率降低。为了监测在药物不敏感的肿瘤中发生的多种改变, 需要高度平行的分析, 例如 DNA 微阵列技术和蛋白质组学分析。这个机会开启了新的维度来预测治疗抵抗力和敏感性。美国国立卫生研究院最近的一项研究, 研究了 60 种肿瘤细胞系(NCI60), 这些细胞系已经用超过 70,000 种不同的药剂独立治疗, 一次一种。在其他结果中, 该研究通过将细胞药物反应与源自 DNA 微阵列的转录组学信息相关联, 将生物信息学和化学信息学联系起来。目的是将相关药物簇与基因改变簇相关联, 从而确定药物基因关系。该方法可以有助于建立确定的表达数据库, 在该数据库上可以建立肿瘤药物反应的个体化分子药理学。通过比较野生型细胞系和对胸苷酸合酶(TS)抑制剂具有抗性的衍生物[16]。能够识别与 TS 抗性相关的某些遗传改变模式。相关的基因表达谱是部分组织依赖性的, 例如, YES1 在上皮细胞系中过表达, 而在淋巴母细胞系中没有上调。通过微阵列分析显示顺铂(cDDP)抗性伴随着编码膜蛋白和糖蛋白激素亚基的基因表达的改变, 其先前未知在 cDDP 抗性中起任何作用。

针对通常用于临床治疗的九种抗癌药物的特征性表达谱测试了 85 种人癌异种移植植物。鉴定了超过 1,500 个基因, 其表达谱在某种程度上与化学敏感性相关。作者确定了一组基因, 这些基因可能部分与特定肿瘤类型(结肠癌, 乳腺癌, 非小细胞肺癌等)对所应用的不同药物的化学敏感性相关[17]。为了预测辅助治疗在食管肿瘤中的疗效, 将 DNA 微阵列技术应用于具有临床已知反应的 20 个癌症标本。确定了 52 个基因, 这些基因可能与患者的结果相关, 并可能与化学敏感性和化学抗性相关。该方法显示了提前确定药物反应的一些潜力。此外, 研究了 19 例急性淋巴细胞白血病患者骨髓样本中对 ABL 酪氨酸激酶抑制剂的耐药性。基于 95 个差异表达的基因, 似乎可以区分响应者和非响应者。因此, 基因表达谱可以有助于抗癌疗法的预处理评估。虽然仍然需要进行 748 次大量实验, 但可能有可能预测化疗耐药性并避免对患者无效的药物和不必要的副作用。治疗前响应者和非响应者之间的区别将进一步刺激个体化治疗策略的发展, 其具有个性化的药物组合。DNA 微阵列分析的缺陷许多研究已经显示出与肿瘤生物学的某些方面相关的特征性表达模式。数十个基因与预后, 耐药性, 转移潜力等有关; 然而, 到目前为止, 结果的临床确认仅在途中。DNA 微阵列的临床应用将需要高水平的再现性和技术可靠性, 样品处理和分析。一个主要障碍是微阵列数据的实验室间和平台间的可重复性仍然很低。Tan 等人在 2003 年描述了这个问题背后的几个原因。三种最广泛使用的商用平台的比较显示出显著的或不一致, 这可能部分地不仅归因于阵列类型之间的差异, 而且归因于用于数据评估的不同算法[18]。2001 年, 已经提出了 MIAME 标准, 其中包括针对某个微阵列实验的预定义信息集, 该实验允许对结果进行独立评估并得出结论。该研究表明, 与之前的报告一样, 所使用的微阵列类型对微阵列数据的可比性影响最大。更重要的是, 作者得出结论, 在应用共同的商业微阵列平台时, 标准化的实验图像分析和数据处理方法可以在不同实验室中进行的实验之间实现高达 0.9 的相关系数。

因此, 仔细的实验设计和整个程序的严格标准化对于微阵列实验的再现性在未来将是至关重要的。此外, 应该牢记在过去几十年中经常阻碍癌症研究的基本挑战。这些包括肿瘤间和肿瘤内异质性, 标本

的提取, 储存或诊断不当, 以及细胞系特性的意外变化。这些并发症仍然具有相关性, 甚至可以通过高通量技术加速。

蛋白质组技术的快速发展将肿瘤诊断提升到了一个新的水平。尽管上面讨论的基于 DNA 和 RNA 的信息具有高度相关性, 但核酸是远离决定疾病特征的生理事件的几个抽象层。蛋白质控制代谢过程, 蛋白质相互作用和翻译后修饰, 因此是未来分子病理学方法中的主要目标。三个应用领域开始出现: (a)高灵敏度质谱耦合基于阵列的复杂蛋白质裂解物分离(表面增强激光解吸飞行时间, SELDITOF)或显微切割肿瘤样品用于早期检测和鉴定人类肿瘤的新生物标志物。(b)直接质谱分析和肿瘤和正常组织蛋白质谱的建立, 和(c)蛋白质和抗体的应用用于特定鉴定某些蛋白质及其在肿瘤中的活化形式的阵列。尽管技术上先进的筛选方法改善了早期癌症检测, 但在一些癌症类型中, 例如卵巢癌, 迫切需要允许容易和常规筛查的新方法来改善目前令人沮丧的临床结果。为此, 高度敏感的 SELDI-TOF 方法似乎是近年来最有前途的技术发展。通过应用来自 50 名健康女性和 50 名卵巢癌患者的血清光谱作为训练集, 他们提出了蛋白质组学特征, 其将癌症与非癌症分离, 灵敏度为 100%, 特异性为 95%。然而, 这些结果受到严厉批评, 并且在最近的出版物中对期望进行了平滑。此外, 这引发了关于建立和证明新技术可靠性的未来过程的激烈辩论。因此, 尽管是一种令人兴奋的新方法[19]。最近表示, 血清蛋白质组分析的现有技术水平允许有相当大的改进空间。虽然血清蛋白质组学分析目前在鉴定新的和早期癌症标志物中进行了测试, 但 SELDITOF 已成功应用于通过激光捕获显微切割的小心解剖的不同肿瘤区域的表征。与前列腺前列腺上皮内瘤(PIN)病变和正常前列腺上皮相比, 该方法用于鉴定在前列腺癌细胞中差异表达的标志物。还开发了类似的实验方案用于膀胱癌, 结肠癌和乳腺癌的蛋白质组学评估。

除了使用质谱法直接鉴定蛋白质之外, 还开发了抗体阵列和所谓的反相蛋白质阵列方法, 并将其应用于肿瘤相关蛋白质及其活化的磷酸化衍生物的鉴定。如今仍处于发育阶段, 两种类型的阵列可能成为 cDNA 或寡核苷酸的有价值替代品, 也可用于日常病理常规期间的免疫组织化学分析。对于这些应用而言, 主要障碍是抗体特异性和亲和力的广泛范围, 这使得确定的抗体-抗原相互作用的检测复杂化。一些研究使用抗体阵列来分析源自肝细胞癌或乳腺癌的肿瘤样本中的蛋白质模式, 在组织微阵列上应用验证策略, 例如标准免疫组织化学, 以证明其平台的特异性。抗体微阵列的有趣衍生物是 RPA。在这种情况下, 代替抗体, 将全蛋白裂解物点在玻璃表面上, 通过抗体检测不同的蛋白质。该程序可与激光捕获显微切割相结合, 每个患者组可应用于微型稀释曲线, 以提高量化准确度并扩大动态范围。RPA 由冷冻组织样品产生, 因此允许使用对磷酸蛋白特异的检测抗体。因此, 该技术被用于比较正常前列腺上皮, PIN 和侵袭性前列腺癌中磷酸化 Akt 和 Erk 测量的存活途径激活。此外, 它已被用于病理学研究滤泡性淋巴瘤中 Bcl-2 和 Akt 家族成员的相对表达水平。可以预见这些方法在阐明酪氨酸激酶受体(如 HER2)下游的细胞内信号传导网络方面的未来意义。

从细胞内癌基因如 RAS 中出现癌症治疗。新的很多物质设计用于干扰特定分子靶标的癌症药物的产生, 其被认为通过调节关键信号传导途径在肿瘤生长中具有关键作用。然而, 这需要开发优化的方案和卓越的检测技术以及 Sheehan 等人最近描述的参考标准的使用。表观基因组学通过向 CpG 二核苷酸中的胞嘧啶残基添加甲基基团对 DNA 的表观遗传修饰是目前已知的肿瘤抑制基因失活的最重要机制之一。与基于 RNA 的基因表达分析相比, 基于 DNA 的甲基化分析具有几个优点。适合于这种实验的 DNA 的制备可以从冷冻和石蜡包埋的组织中成功获得。此外, 根据目前的知识, 基因的甲基化是相当稳定的修饰, 由于 RNA 衰变而不像 mRNA 表达分析那样产生尽可能多的伪影。现在设计甲基化阵列用于在不同 CpG 位置的 DNA 甲基化的高通量分析。此外, 最近开发了一种基于实时 PCR 的基因和甲基化特异性检测方法。对于甲基化阵列, 来自研究组织的基因组 DNA 用亚硫酸氢钠处理, 导致未甲基化的胞嘧啶残基转化为尿嘧啶。在该程序之后, 使用荧光标记的引物对来自含有 CpG 的调节区域的特定片段进行 PCR 扩增。

在 PCR 扩增期间,尿嘧啶残基(UpG)被酪氨酸残基(TpG)取代。然后将这些片段与点在微阵列上的互补寡核苷酸杂交,所述微阵列对最初的非甲基化 CpG 二核苷酸是特异性的[20]。

此类应用已用于鉴定与肿瘤进展相关的 CpG 岛甲基化,并评估化疗后卵巢癌患者无病生存的潜在意义。此外,复杂的技术(甲基化目标阵列)能够同时检测数百个肿瘤样本中已知肿瘤抑制基因如 WT1, BRCA1, p16INK4A 等的 CpG 岛甲基化。一个有趣的进一步发展是表达和甲基化阵列的组合使用,甚至结合使用相同组织样品的组蛋白乙酰化的分析。这种方法允许甲基化数据与表达数据的相关性和具有更高准确度的含有高甲基化 CpG 岛的功能相关基因的鉴定。尽管已经存在大量关于肿瘤组织中 DNA 甲基化的高通量分析的出版物,但显然必须进一步开发该技术以进入常规临床诊断程序。然而,很明显,在将来,需要结合转录组学,蛋白质组学和表观基因组学分析来鉴定与预后和治疗具有最高相关性的肿瘤特异性改变。这种发展与在不久的将来可以显著改善肿瘤治疗的期望密切相关[21]。

## 5. 展望

迄今为止,对新抑制剂起反应的患者百分比通常低于 30%。这表明基于单个靶分子的免疫组织化学或 DNA 分析的诊断方法的当前组合仍然不足。为了鉴定那些将受益于新疗法的患者,必须开发能够在治疗前和治疗期间检测肿瘤中限速致癌途径的特殊方法,并使其适应常规诊断病理学。这显然将在病理研究所的未来任务中发挥越来越大的作用。在将这种综合方法传播和建立到日常生活中之前,必须进行广泛的研究以允许对临床材料中某种途径的激活进行公司预测。在这种情况下,由基因表达和甲基化的平行分析以及活化的信号传导途径和表达的蛋白质的蛋白质组学分析组成的策略将是最佳的选择。生物信息学程序的实施将进行进一步的标准化以及高度平行的组织分析,为人类癌症组织的广泛分析打开了大门,从而提高了预测单个肿瘤的生物行为的可能性。这种“多重方法”可以有助于在功能上对恶性肿瘤进行分类,条件是从常规组织病理学结合免疫组织化学开始的“诊断算法”提供了基础。然后通过专门的疾病特异性分析(例如不同种类的微阵列)来补充这种基本评估,以预测肿瘤相关特征,包括肿瘤进展,药物反应和转移潜能,这将对肿瘤预后和充分的个体治疗产生重要影响。最近的技术发展也表明在未来几年内对常规病理诊断的需求不断变化。只有随后将本综述中描述的方法整合到病理诊断中,才能保证,在将来,病理学也是掌握疾病病因学和疾病机制知识主体的学科。然而,证明对患者存在实际益处的证据仍然是开放的,例如,更长的存活时间或更好的治疗反应。只有在设计良好的临床研究证明了这一进展的情况下,采用个体化治疗策略实施分子肿瘤分析才能被普遍纳入癌症的诊断和治疗中。有利方式的一个主要先决条件是基础科学家,临床导向医师,诊断病理学家和临床医生的跨学科合作,他们都必须使用相同的“语言”。他们必须了解他们的合作伙伴。不同研究人员群体之间的“翻译”将是现代实验和诊断病理学中最具挑战性的任务之一。

## 参考文献

- [1] Armstrong, S.A., Staunton, J.E., Silverman, L.B., Pieters, R., den Boer, M.L., Minden, M.D., Sallan, S.E., Lander, E.S., Golub, T.R. and Korsmeyer, S.J. (2002) MLL Translocations Specify a Distinct Gene Expression Profile That Distinguishes a Unique Leukemia. *Nature Genetics*, **30**, 41-47. <https://doi.org/10.1038/ng765>
- [2] Baggerly, K.A., Morris, J.S., Edmonson, S.R. and Coombes, K.R. (2005) Signal in Noise: Evaluating Reported Reproducibility of Serum Proteomic Tests for Ovarian Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, **97**, 307-309. <https://doi.org/10.1093/jnci/dji008>
- [3] Baylin, S.B., Esteller, M., Rountree, M.R., Bachman, K.E., Schuebel, K. and Herman, J.G. (2001) Aberrant Patterns of DNA Methylation Chromatin Formation and Gene Expression in Cancer. *Human Molecular Genetics*, **10**, 687-692. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.7.687>
- [4] Bertucci, F., Nasser, V., Granjeaud, S., Eisinger, F., Adelaide, J., Tagett, R., Loriod, B., Giaconia, A., Benziene, A., Devilard, E., Jacquemier, J., Viens, P., Nguyen, C., Birnbaum, D. and Houlgatte, R. (2002) Gene Expression Profiles

- of Poor-Prognosis Primary Breast Cancer Correlate with Survival. *Human Molecular Genetics*, **11**, 863-872. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.8.863>
- [5] Bertucci, F., Viens, P., Hingamp, P., Nasser, V., Houlgatte, R. and Birnbaum, D. (2003) Breast Cancer Revisited Using DNA Arraybased Gene Expression Profiling. *International Journal of Cancer*, **103**, 565-571. <https://doi.org/10.1002/ijc.10867>
- [6] Brazma, A. and Vilo, J. (2000) Gene Expression Data Analysis. *FEBS Letters*, **480**, 17-24. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01772-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01772-5)
- [7] Cowherd, S.M., Espina, V.A., Petricoin III, E.F. and Liotta, L.A. (2004) Proteomic Analysis of Human Breast Cancer Tissue with Laser Capture Microdissection and Reverse-Phase Protein Microarrays. *Clinical Breast Cancer*, **5**, 385-392. <https://doi.org/10.3816/CBC.2004.n.046>
- [8] Dancey, J. and Sausville, E.A. (2003) Issues and Progress with Protein Kinase Inhibitors for Cancer Treatment. *Nature Reviews Drug Discovery*, **2**, 296-313. <https://doi.org/10.1038/nrd1066>
- [9] Dhanasekaran, S.M., Barrette, T.R., Ghosh, D., Shah, R., Varambally, S., Kurachi, K., Pienta, K.J., Rubin, M.A. and Chinnaiyan, A.M. (2001) Delineation of Prognostic Biomarkers in Prostate Cancer. *Nature*, **412**, 822-826. <https://doi.org/10.1038/35090585>
- [10] Diamandis, E.P. (2004) Analysis of Serum Proteomic Patterns for Early Cancer Diagnosis: Drawing Attention to Potential Problems. *Journal of the National Cancer Institute*, **96**, 353-356. <https://doi.org/10.1093/jnci/djh056>
- [11] Diamandis, E.P. and van der Merwe, D.E. (2005) Plasma Protein Profiling by Mass Spectrometry for Cancer Diagnosis: Opportunities and Limitations. *Clinical Cancer Research*, **11**, 963-965.
- [12] Eisen, M.B., Spellman, P.T., Brown, P.O. and Botstein, D. (1998) Cluster Analysis and Display of Genome-Wide Expression Patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**, 14863-14868. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.25.14863>
- [13] Eschrich, S., Yang, I., Bloom, G., Kwong, K.Y., Boulware, D., Cantor, A., Coppola, D., Kruhoffer, M., Aaltonen, L., Orntoft, T.F., Quackenbush, J. and Yeatman, T.J. (2005) Molecular Staging for Survival Prediction of Colorectal Cancer Patients. *Journal of Clinical Oncology*, **23**, 3526-3535. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.00.695>
- [14] Goldmann, T., Flohr, A.M., Murua, E.H., Gerstmayer, B., Janssen, U., Bosio, A., Loeschke, S., Vollmer, E. and Bullerdiek, J. (2004) The HOPE-Technique Permits Northern Blot and Microarray Analyses in Paraffin-Embedded Tissues. *Pathology—Research and Practice*, **200**, 511-515. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2004.04.008>
- [15] Hofmann, W.K., de Vos, S., Elashoff, D., Gschaidmeier, H., Hoelzer, D., Koeffler, H.P. and Ottmann, O.G. (2002) Relation between Resistance of Philadelphia-Chromosome-Positive Acute Lymphoblastic Leukaemia to the Tyrosine Kinase Inhibitor STI571 and Gene Expression Profiles: A Gene-Expression Study. *The Lancet*, **359**, 481-486. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)07678-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)07678-X)
- [16] Huang, E., Cheng, S.H., Dressman, H., Pittman, J., Tsou, M.H., Horng, C.F., Bild, A., Iversen, E.S., Liao, M., Chen, C.M., West, M., Nevins, J.R. and Huang, A.T. (2003) Gene Expression Predictors of Breast Cancer Outcomes. *The Lancet*, **361**, 1590-1596. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)13308-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)13308-9)
- [17] Hudelist, G., Pacher-Zavisin, M., Singer, C.F., Holper, T., Kubista, E., Schreiber, M., Manavi, M., Bilban, M. and Czerwenka, K. (2004) Use of High-Throughput Protein Array for Profiling of Differentially Expressed Proteins in Normal and Malignant Breast Tissue. *Breast Cancer Research and Treatment*, **86**, 281-291. <https://doi.org/10.1023/B:BREA.0000036901.16346.83>
- [18] Jones, P.A. and Baylin, S.B. (2002) The Fundamental Role of Epigenetic Events in Cancer. *Nature Reviews Genetics*, **3**, 415-428. <https://doi.org/10.1038/nrg816>
- [19] Khan, J., Simon, R., Bittner, M., Chen, Y., Leighton, S.B., Pohida, T., Smith, P.D., Jiang, Y., Gooden, G.C., Trent, J.M. and Meltzer, P.S. (1998) Gene Expression Profiling of Alveolar Rhabdomyosarcoma with cDNA Microarrays. *Cancer Research*, **58**, 5009-5013.
- [20] Khan, J., Wei, J.S., Ringner, M., Saal, L.H., Ladanyi, M., Westermann, F., Berthold, F., Schwab, M., Antonescu, C.R., Peterson, C. and Meltzer, P.S. (2001) Classification and Diagnostic Prediction of Cancers Using Gene Expression Profiling and Artificial Neural Networks. *Nature Medicine*, **7**, 673-679. <https://doi.org/10.1038/89044>
- [21] Kusnezow, W., Jacob, A., Walijew, A., Diehl, F. and Hoheisel, J.D. (2003) Antibody Microarrays: An Evaluation of Production Parameters. *Proteomics*, **3**, 254-264. <https://doi.org/10.1002/pmic.200390038>

**知网检索的两种方式：**

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>  
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2326-3490，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>  
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：[acrvm@hanspub.org](mailto:acrvm@hanspub.org)