

口腔鳞状细胞癌及癌旁正常组织基因表达谱芯片检测

郑建伟^{1,2}, 杨淑娟³, 利小平², 韦从云², 李婷², 莫文娟², 蔡秋云², 杨德群², 周磊¹, 罗刚¹(¹南方医科大学附属广东省口腔医院, 广东省广州市 510280; ²广东省深圳牙科医疗中心, 广东省深圳市 518001; ³四川大学华西公共卫生学院健康与社会行为学系, 四川省成都市 610041)

文章亮点:

- 1 实验通过基因表达谱芯片大范围筛选口腔鳞状细胞癌与癌旁正常组织的差异基因。
- 2 实验比较正常组织和肿瘤组织的基因表达谱可以获得表达差异基因, 并从这些差异表达基因中发现疾病原因的线索, 为肿瘤发生机制的发现、诊断和治疗提供依据。
- 3 实验采用癌旁正常组织作为对照并混合 2 个病例样本来减少个体差异。

关键词:

实验动物; 组织工程; 口腔鳞状细胞癌; 基因芯片; 基因表达谱芯片; Roche NimbleGen 全基因组表达谱芯片; 差异基因; 生物信息学分析; DNA; 质量评价; 国家自然科学基金

主题词:

组织工程; 芯片分析技术; 口腔鳞状细胞癌; 肿瘤

基金资助:

广东省医学科学研究基金资助项目(A2011092); 国家自然科学基金资助项目(81271159/H1405)

摘要

背景:近年在整体水平上以高通量分子扫描手段为基础的基因组学、蛋白质组学以及计算机辅助设计等技术的整合及相互关联的“技术链”的应用已在乳腺癌、肺癌、胃癌、结肠癌、卵巢癌、黑色素瘤等的研究中取得了丰硕的成果, 但关于口腔鳞状细胞癌的研究较少。

目的:实验通过基因表达谱芯片检测口腔鳞状细胞癌组织与癌旁正常组织的基因表达谱。

方法:收集广东省口腔医院 2013 年手术切除的口腔鳞癌及癌旁正常组织各 2 例, 采用 Roche NimbleGen 全基因组表达谱芯片进行口腔鳞癌及癌旁正常组织的基因表达谱检测。

结果与结论:按差异基因筛选标准, 从 32 448 条检测基因中筛选出口腔鳞癌肿瘤组织的差异基因共有 7 872 条, 占筛选基因总数的 24%; 其中上调表达的基因有 3 800 条, 下调表达的有 4 072 条。结果证实, 通过基因表达谱芯片检测并根据表达差异 1 倍以上的筛选标准得到了 7 872 个表达差异的基因。由此可见肿瘤的发生发展不是单个或几个基因的作用结果, 以往实验往往针对某个或某几个基因的研究有很大的局限性。同时也说明了肿瘤的产生是多基因成网络相互调节作用的结果, 而且这个网络的作用关系是非常复杂的。

郑建伟, 杨淑娟, 利小平, 韦从云, 李婷, 莫文娟, 蔡秋云, 杨德群, 周磊, 罗刚. 口腔鳞状细胞癌及癌旁正常组织基因表达谱芯片检测[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(27):4365-4370.

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2015.27.019

DNA chip-based gene expression profiling of oral squamous cell carcinoma tissue and normal paracarcinoma tissue

Zheng Jian-wei^{1,2}, Yang Shu-juan³, Li Xiao-ping², Wei Cong-yun², Li Ting², Mo Wen-juan², Cai Qiu-yun², Yang De-qun², Zhou Lei¹, Luo Gang¹ (¹Affiliated Stomatology Hospital of Guangdong Province, South Medical University, Guangzhou 510280, Guangdong Province, China; ²Shenzhen Dental Medical Center of Guangdong Province, Shenzhen 518001, Guangdong Province, China; ³Department of Public Health and Social and Behavioral Sciences, West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan Province, China)

Abstract

BACKGROUND: In recent years, based on high-throughput molecular imaging, integration of genomics, proteomics and computer aided design and the application of correlative “technical chains” have achieved great achievements in the research of breast cancer, lung cancer, gastric cancer, colon cancer, ovarian cancer and melanin tumor. However, there are few researches on oral squamous cell carcinoma.

OBJECTIVE: To detect the gene expression profile of the oral squamous cell carcinoma tissue and normal paracarcinoma tissue using DNA chip-based gene expression profile.

METHODS: Two samples of oral squamous cell carcinoma tissue and normal paracarcinoma tissue of patients who received treatment at Stomatological Hospital of Guangdong Province of China in 2013 were included in this study. The gene expression profiles of oral squamous cell carcinoma and normal paracarcinoma tissue were determined by the Roche NimbleGen gene expression microarrays.

郑建伟, 男, 1981 年生, 汉族, 四川省成都市人, 南方医科大学在读博士, 主治医师, 主要从事口腔医学方面的研究。

通讯作者: 罗刚, 博士, 主任医师, 南方医科大学附属广东省口腔医院, 广东省广州市 510280

通讯作者: 周磊, 博士, 主任医师, 南方医科大学附属广东省口腔医院, 广东省广州市 510280

中图分类号:R318

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2015)27-04365-06

稿件接受: 2015-04-20

http://www.crter.org

Zheng Jian-wei, Studying for doctorate, Attending physician, Affiliated Stomatology Hospital of Guangdong Province, South Medical University, Guangzhou 510280, Guangdong Province, China; Shenzhen Dental Medical Center of Guangdong Province, Shenzhen 518001, Guangdong Province, China

Corresponding author: Luo Gang, M.D., Chief physician, Affiliated Stomatology Hospital of Guangdong Province, South Medical University, Guangzhou 510280, Guangdong Province, China

Corresponding author: Zhou Lei, M.D., Chief physician, Affiliated Stomatology Hospital of Guangdong Province, South Medical University, Guangzhou 510280, Guangdong Province, China

Accepted: 2015-04-20

RESULTS AND CONCLUSION: According to screening criteria of differential genes, 7 872 out of 32 448 detected genes were differentially expressed genes of oral squamous cell carcinoma, which accounts for 24% of the total number of the screening genes. 3 800 genes were up-regulated, and 4 072 were down-regulated. The results confirm that through detection with the help of gene expression profile chip, 7 872 differentially expressed genes were obtained through DNA chip-based gene expression profiles according to the screening criteria. Thus it can be concluded that the occurrence and development of the tumors are not a result of single or several genes. Previous experiments based on a single or several genes have great limitations. These findings also suggest that the occurrence of tumor is a result of mutual regulatory effects of many genes forming a network, moreover, the interactions of the network is quite complicated.

Subject headings: Tissue Engineering; Microchip Analytical Procedures; Oral Spray; Tumor

Funding: Medical Science Research Foundation of Guangdong Province of China, No. A2011092; the National Natural Science Foundation of China, No. 81271159H1405

Zheng JW, Yang SJ, Li XP, Wei CY, Li T, Mo WJ, Cai QY, Yang DQ, Zhou L, Luo G. DNA chip-based gene expression profiling of oral squamous cell carcinoma tissue and normal paracarcinoma tissue. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2015;19(27):4365-4370.

0 引言 Introduction

基因芯片是目前技术最可靠、应用最多的一种生物芯片, 又叫DNA芯片、DNA微阵列(DNA microarray), 其制作原理是将大量的寡核苷酸或者eDNA片段预先设计好, 在载体上高密度且有序的排列制成芯片。检测样品用荧光染料(如Cy3、Cy5等)标记制备成探针, 探针与芯片按照碱基配对的原则相互反应, 结果通过激光共聚焦、荧光扫描等方法采集信号, 获得检测样品分子的序列信息, 再由计算机分析获得图像和数据。因此可以在全基因组水平同时分析研究基因的序列及功能, 一次获得大量的数据并进行分析。

近年在整体水平上以高通量分子扫描手段为基础的基因组学、蛋白质组学以及计算机辅助设计等技术的整合及相互关联的“技术链”的应用等为肿瘤的研究提供了新的契机, 并且已经在乳腺癌、肺癌、胃癌、结肠癌、卵巢癌、黑色素瘤等的研究中取得了丰硕的成果^[1]。实验通过基因表达谱芯片检测和筛选口腔鳞状细胞癌组织与正常癌旁组织的差异基因, 从中寻找病因线索, 为早期诊断及根治提供依据。

1 对象和方法 Subjects and methods

设计: 基因学实验。

时间及地点: 于2013年1月至12月在广东省口腔医院完成。

对象: 收集广东省口腔医院等2013年手术切除的口腔鳞癌及癌旁正常组织各2份及鳞癌组和癌旁组, 均经病理学诊断证实, 所有患者术前均未接受任何形式的治疗。正常对照来自同一患者手术安全边界组织(2 cm以上)。

基因芯片: 实验研究使用Roche NimbleGen全基因组表达谱芯片, 芯片型号为Roche NimbleGen Homo_Sapiens 12x135k。

实验方法:

口腔鳞癌组织和癌旁正常组织总RNA的提取、纯化和质量检测: 通过样本组织匀浆、Trizol组织匀浆两相分离、

样本组织RNA沉淀、样本组织RNA清洗、重新溶解样本组织RNA沉淀的方法进行样本总RNA的提取并使用Rneasy试剂盒对总RNA过柱纯化。提取和纯化总RNA后, 将每组的2个样本取等量RNA混合, 用于后续试验。

口腔鳞状细胞癌的基因表达谱芯片检测相关试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
双链cDNA合成试剂盒, Superscript II反转录试剂盒, Trizol	Invitrogen公司
NimbleGen芯片杂交试剂盒, NimbleGen HX12 mixer, NimbleGen洗涤缓冲试剂盒, NimbleGen单色DNA标记试剂盒	NimbleGen公司
2X PCR master mix	Superarray公司
RNase A, Klenow酶	Sigma公司
RNeasy小型试剂盒	Qiagen公司
ND-1000紫外分光光度计, 琼脂糖凝胶电泳系统	NanoDrop公司

样本组织RNA定量和质量控制: 用NanoDrop ND-1000的紫外线分光光度计测定待检测样本RNA在260 nm、280 nm和230 nm处的吸光度值(A), 得到其 $A_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 值(蛋白质污染), $A_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 值(有机化合物污染), 以计算浓度并评估纯度。使用标准变性琼脂糖凝胶电泳, 检测样本组织提取的RNA纯度及完整性。

探针标记及分析: RNA反转录生成cDNA, cDNA制备, Cy3标记cDNA; 基因芯片杂交与洗涤; 芯片扫描及图像采集: 基因芯片用Axon GenePix 4000B microarray 扫描仪进行扫描, 采用NimbleScan (version 2.5) 图像分析软件对芯片图像进行分析, 然后通过Agilent GeneSpring GX (version 12.0)软件对其进行进一步分析。差异基因筛选标准: 表达水平改变1倍作为判断是否有表达差异的标准。

2 结果 Results

2.1 NanoDrop ND-1000紫外线分光光度计进行标本总RNA数量和质量保证的检测结果 该基因芯片要求 $A_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 比值和 $A_{260\text{ nm}}/A_{230\text{ nm}}$ 比值大于1.8。实验标本通

过NanoDrop ND-1000紫外线分光光度计检查结果显示: 4个组织标本RNA的 $A_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 值分别为1.95, 1.92, 1.93, 1.94, $A_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 值分别为2.28, 2.31, 2.14, 2.23, 比值均大于1.8, RNA质量符合芯片要求, 见表1。

表1 NanoDrop ND-1000 紫外线分光光度计检测样本 RNA 质量
Table 1 The RNA quality of samples tested by NanoDrop ND-1000 ultraviolet spectrophotometer

样本编号	$A_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$	$A_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$	质量检测结果
鳞癌组 1	1.95	2.28	合格
鳞癌组 2	1.92	2.31	合格
癌旁组 3	1.93	2.14	合格
癌旁组 4	1.94	2.23	合格

表注: 4个组织标本 RNA 的检测结果均大于 1.8, RNA 质量符合芯片要求。

2.2 标准变性琼脂糖凝胶电泳测试RNA的完整性和gDNA污染物 电泳实验结果显示: 4个组织标本的总RNA样本3条带清晰, 不拖尾, 表明纯度较好, 而28S rRNA的亮度是18S rRNA的2倍, 表明总RNA完整性好, 未发生降解, 可以用于后续实验。见图1。

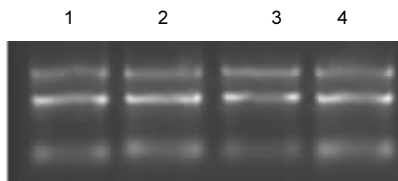


图1 标准变性琼脂糖凝胶电泳测试 RNA 的完整性和 gDNA 污染物
Figure 1 RNA integrity and gDNA contamination tested by standard denaturing agarose gel electrophoresis

图注: 图中 1, 2 为鳞癌组, 3, 4 为癌旁组, 4 个组织标本的总 RNA 样本 3 条带清晰; 28S rRNA 的亮度是 18S rRNA 的 2 倍。

2.3 Nanodrop ND-1000 紫外线分光光度计检测样本 ds-cDNA 质量 该基因芯片要求 $A_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ (蛋白质污染)和 $A_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ (有机化合物污染)大于1.8。口腔鳞癌和癌旁正常癌旁组织实验标本 $A_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 分别为1.95和1.99, $A_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ A_{260}/A_{230} 比值分别为2.15和2.09, 标本符合芯片要求, 见表2。

表2 NanoDrop ND-1000 紫外线分光光度计检测样本 ds-cDNA 质量
Table 2 The ds-cDNA quality of samples tested by NanoDrop ND-1000 ultraviolet spectrophotometer

样本编号	$A_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$	$A_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$	质量检测结果
鳞癌组	1.95	2.15	合格
癌旁组	1.99	2.09	合格

表注: 两组基因芯片 $A_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 和 $A_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 大于 1.8, 质量检测合格。

2.4 Nanodrop ND-1000 紫外线分光光度计进行标记后 DNA 的质量保证 该基因芯片要求 $A_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ (蛋白质污染)和 $A_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ (有机化合物污染)大于1.8。口腔鳞癌和癌旁正常癌旁组织实验标本 $A_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 分别为1.92和1.92,

$A_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 分别为2.22和2.23, 标本符合芯片要求。见表3。

表3 NanoDrop ND-1000 紫外线分光光度计检测样本标记后 DNA 的质量保证
Table 3 The DNA quality of labeled samples tested by NanoDrop ND-1000 ultraviolet spectrophotometer

样本编号	$A_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$	$A_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$	质量检测结果
Test	1.92	2.22	合格
Control	1.92	2.23	合格

表注: 两组基因芯片 $A_{260\text{ nm}/280\text{ nm}}$ 和 $A_{260\text{ nm}/230\text{ nm}}$ 大于 1.8, 质量检测合格。

2.5 基因表达谱芯片荧光信号扫描图 使用Axon GenePix 4000B 芯片扫描仪对2组混合后的口腔鳞状细胞癌组织和癌旁正常癌旁组织表达谱芯片的荧光强度进行扫描。其荧光信号扫描图结果显示: 芯片杂交信号强度高且均一, 基因点清晰, 均衡, 说明该表达谱芯片实验总体结果理想。见图2。

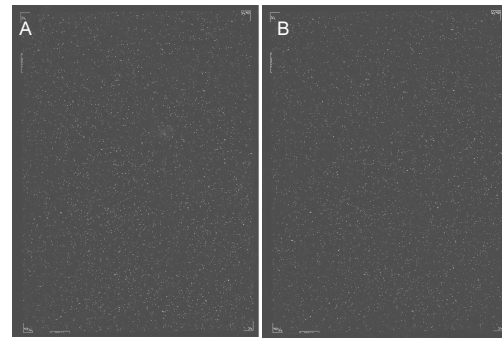


图2 NimbleGe 基因表达谱芯片荧光信号扫描图
Figure 2 The scans of fluorescence signal of NimbleGen gene expression microarrays

图注: 图中 A 为鳞癌组, B 为癌旁组。图中芯片杂交信号强度高且均一, 基因点清晰, 均衡。

2.6 基因表达谱芯片数据质量评价 用NimbleScan v2.5 软件对各样本原始数据进行标准化处理后作Box-Plot图显示: 所有样本的 \log_2 比率分布基本上是相同的, 未见明显差异, 均可用于进一步数据分析。见图3。

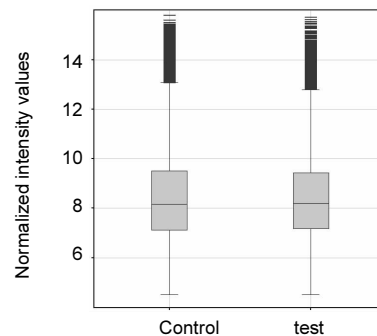


图3 NimbleScan v2.5 软件标准化处理样本原始数据的 Box-Plot 图
Figure 3 The Box-Plot picture of sample raw data dealt by the software of NimbleScan v2.5

图注: 所有样本的 \log_2 比率分布基本相同, 未见明显差异。

散点图(Scatter Plot图): X/Y轴是每个样本的标准化信号值(log₂形式), 绿色线是折叠变化线(折叠变化默认值是2.0, 在顶面绿色线以上和底下绿色线以下的基因代表两个互相比较的芯片里超过2.0折叠值的基因)。如图4所示, 表达谱芯片的散点图中点的分布大部分集中在上下2条绿色线之间及周围, 但仍有部分点的分布远离这2条绿色线, 说明存在许多表达发生显著性改变的基因。

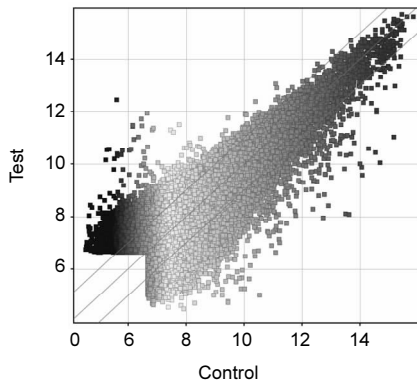


图4 NimbleScan v2.5 软件处理样本原始数据的散点图

Figure 4 The Scatter Plot picture of raw data dealt by the software of NimbleScan v2.5

图注: 表达谱芯片的散点图中点的分布大部分集中在上下2条绿色线之间及周围, 但仍有部分点的分布远离这2条绿色线。

分层聚类图(hierarchical clustering): 分层聚类分析是使用最广泛的一种分析基因表达数据的聚类方法。分层聚类分析法通过对样本的基因表达水平重新分组, 从而表达样本之间的关系。红色表示表达相对较高的基因, 绿色表示表达相对较低的基因。可以看出两组间的表达谱明显不同, 见图5。

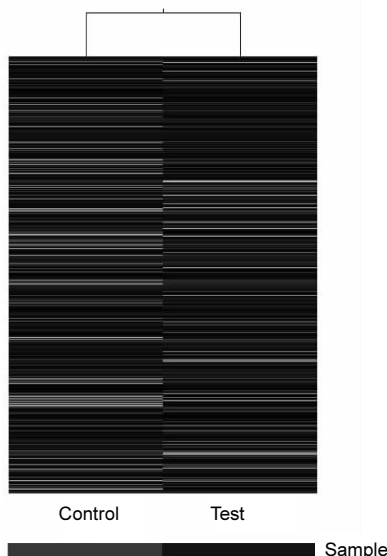


图5 NimbleScan v2.5 软件处理样本原始数据的分层聚类图

Figure 5 The hierarchical clustering picture of raw data dealt by the software of NimbleScan v2.5

图注: 红色表示表达相对较高的基因, 绿色表示表达相对较低的基因。可以看出两组间的表达谱明显不同。

2.7 基因表达谱芯片数据结果 按差异基因筛选标准, 从32 448条检测基因中筛选出口腔鳞癌肿瘤组织与癌旁正常癌旁组织差异表达基因共有7 872条, 占检测到基因总数的24%, 其中上调表达的基因有3 800条, 下调表达的有4 072条。

3 讨论 Discussion

大多数已发表的研究, 都把表达水平改变1倍作为判断是否有表达差异的标准, 但这不是绝对的, 可以根据实际的实验结果情况自行调整。根据筛选差异基因的标准实验的基因表达谱芯片筛选出的差异基因有7 872个基因, 占检测到基因总数的24%。其中上调表达的基因有3 800条, 下调表达的有4 072条。通过查阅文献比较实验筛选的差异基因与以往文献研究的结论, 结果大部分基因与文献报道的变化趋势一致。不一致部分基因中, 有一部分本身就存在不确定性, 有的报道结果上调, 有的则结果相反, 所以实验的基因表达谱芯片数据结果有较高的可靠性。同时分析文献发现, 以往大部分研究往往只检测或者研究其中一个或者几个少量的基因, 而实验查阅文献时发现, 筛选出的大量差异基因经不同文献证实都参与到了肿瘤或者疾病的各个过程中, 发挥不同的功能作用, 所以实验相信肿瘤的发生不应该是其中少数的基因发生了改变, 而是其中很多基因发生改变的多阶段多步骤综合结果, 当基因的改变到了一定程度后, 肿瘤才会发生发展起来。所以肿瘤机制的研究要把各个变化的基因综合起来, 各个信号通路的关系联系起来, 从整体上去发现它们之间的相互作用关系网络, 最后才能找出根本的发生机制。由于差异基因的数量众多且相互作用关系复杂, 要全面揭示它们之间的作用关系还需要很长的路要走。

通过查阅文献实验发现实验结果也以往文献有很大的一致性, 表达下调的基因例如S100家族、Annexins家族、CSTB基因和 α -B crystallin(CRYAB)等。S100家族属于钙离子结合蛋白。大量研究表明在肿瘤侵袭过程中S100往往表达下调, 可能是一个抑癌基因^[2-9], 而实验的基因表达谱芯片研究也有一致结果。Annexins家族, Annexins家族是钙依赖性磷脂结合蛋白家族, 在细胞信号传导、炎症反应、钙离子信号通道、肿瘤增殖分化及细胞骨架蛋白间的相互作用等方面发挥重要作用^[10]。Xue等^[11-19]研究发现Annexins家族在多种肿瘤中表达下调。同时有众多实验研究表明, CSTB基因在肿瘤的生长、侵袭和转移中发挥着重要的作用^[20-25]。表达上调的基因中比较重要的例如Stathmin, LGALS7, EIF5A, TAGLN等差异基因对肿瘤的生长侵袭, 迁移的起积极的促进作用^[26-36]。

在对差异基因文献分析时发现一些不一致的差异基因, 甚至有一些是某些学者认为的抑癌基因, 而在实验的结果中表达上调。这样不一致的原因, 实验分析可能有以下几点: 第一, 个体差异, 由于经费限制实验基因芯片检

测的样本不够大, 而患者之间也是有个体差异的, 某些基因在不同的患者的表达可能存在差异。第二, 抑癌基因在不同的肿瘤中也可能发挥不同的作用, 因为这个基因编码的蛋白在翻译的过程可能出现变异, 从而引起功能上的变化, 进而对肿瘤的调节机制可能不同, 甚至完全相反。比如野生型p53是普遍认同的一种抑癌基因, 但是它的抑癌功能常因突变而消失, 使细胞无限分裂增殖, 导致癌症的发生^[37-38]。第三, 抑癌基因与其目标基因可能是双向作用的, 当这个抑癌基因调节的目标基因由于其他基因的作用, 发生的变化很大时, 这个抑癌基因要发挥它抑制调节作用, 其本身也可能会上调。但是本身的上调作用没有目标基因变化的作用大, 所以最终没有抑制肿瘤的发生。虽然其本身也是上调了的, 但是它发挥的功能仍然是抑癌作用, 所以基因情况并不能等同于蛋白情况。第四, 抑癌基因在不同的肿瘤和调节通路中, 可能发挥不同的作用, 某条信号通路中的抑癌基因可能在另一条信号通路中促进肿瘤的发展。如ARHGDI2基因的编码蛋白RhoGDI2在肿瘤中的作用存在争议。Schunke等^[39]研究发现RhoGDI2蛋白在恶性肿瘤中可能通过以下两种不同的作用机制产生相反的作用: 一种机制是RhoGDI2蛋白可以增加促癌蛋白Cox-2的表达进而促进肿瘤细胞的发展, 另一种机制是通过抑制肿瘤细胞的迁移从而抑制肿瘤的进展, 在不同的肿瘤中, 其发挥的作用可能截然相反。Zhang等^[40]研究发现RhoGDI2蛋白在乳腺癌细胞中的表达上调并能使肿瘤细胞的侵袭和转移增强。Cho等^[41]对胃癌组织检测后也发现, RhoGDI2蛋白在胃癌组织中的表达上调并能促进胃癌的进展。而在膀胱癌和肺癌中的一些相关研究中RhoGDI2蛋白也表达上调并发挥抑制肿瘤细胞转移的作用^[42-43]。实验不能根据基因的表达水平去确定其功能, 不是表达上调的基因就会促进肿瘤发展, 下调的基因就是抑癌基因。

在实验中, 最好是进行大量的标本分别进行基因表达谱芯片的检测, 但是由于基因表达谱芯片费用昂贵和经费限制, 实验没有办法进行大标本量的实验, 所以实验结果具有一定的局限性。为了尽量减小这种局限性的影响, 实验采用了两个组织标本混合的方法来减少个体间的差异。

通过基因表达谱芯片的检测, 实验初步了解了口腔鳞癌组织与癌旁正常癌旁组织的基因表达及变化情况, 也筛选出了大量的差异基因, 通过文献比较也初步肯定了芯片结果的可信性, 为后续实验奠定基础。在后一步实验中实验将对这些差异基因进行功能分析。

作者贡献: 郑建伟进行实验设计、实施及成文。实验评估和审核为罗刚。资料收集为利小平、董俊英、曾宪丽、梁友龙、韩帮峰、周磊和杨德群。郑建伟对文章负责。

利益冲突: 文章内容不涉及利益冲突。

伦理要求: 根据中华人民共和国国务院颁发的《医疗机构管理条例》, 在实验前将实验方案和风险告知对方, 并签署知情同意书。

学术术语: 基因芯片-又叫 DNA 芯片、DNA 微阵列。其制作原理是将大量的寡核苷酸或 cDNA 片段在载体上高密度且有序的排列制成芯片, 探针与芯片按照碱基配对的原则相互反应。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Berndt U, Philipson L, Bartsch S, et al. Systematic high-content proteomic analysis reveals substantial immunologic changes in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2008;68(3):880-888.
- [2] Krop I, März A, Carlsson H, et al. A putative role for psoriasis in breast tumor progression. *Cancer Res.* 2005;65(24):11326-11334.
- [3] Bresnick AR, Weber DJ, Zimmer DB. S100 proteins in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2015;15(2):96-109.
- [4] Diaconescu DE, Dima L, Marinescu DM, et al. S100-positive dendritic cells in squamous cell laryngeal cancer. *Rom J Morphol Embryol.* 2014;55(4):1371-1375.
- [5] Jaiswal JK, Nylandsted J. S100 and annexin proteins identify cell membrane damage as the Achilles heel of metastatic cancer cells. *Cell Cycle.* 2015;14(4):502-509.
- [6] Meghni V, Wagh A, Indurthi VS, et al. The receptor for advanced glycation end products influences the expression of its S100 protein ligands in melanoma tumors. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014;57:54-62.
- [7] Funk S, Mark R, Bayo P, et al. High S100A8 and S100A12 protein expression is a favorable prognostic factor for survival of oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2015;136(9):2037-2046.
- [8] Zaidi AH, Gopalakrishnan V, Kasi PM, et al. Evaluation of a 4-protein serum biomarker panel-biglycan, annexin-A6, myeloperoxidase, and protein S100-A9 (B-AMP)-for the detection of esophageal adenocarcinoma. *Cancer.* 2014;120(24):3902-3913.
- [9] Grandi F, Rocha RM, Miot HA, et al. Immunoexpression of S100A4 in canine skin melanomas and correlation with histopathological parameters. *Vet Q.* 2014;34(2):98-104.
- [10] Gerke V, Moss SE. Annexins: from structure to function. *Physiol Rev.* 2002;82(2):331-371.
- [11] Xue LY, Hu N, Song YM, et al. Tissue microarray analysis reveals a tight correlation between protein expression pattern and progression of esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2006;6:296.
- [12] Pogosian GG, Mikaelian MV, Avagian AKh, et al. The annexin 5 in serums of pregnant women and patients with particular types of cancer. *Klin Lab Diagn.* 2014;(4):14-17.
- [13] Berri F, Haffar G, Lê VB, et al. Annexin V incorporated into influenza virus particles inhibits gamma interferon signaling and promotes viral replication. *J Virol.* 2014;88(19):11215-11228.
- [14] Boudhria Z, Rondepierre F, Ouchchane L, et al. Annexin A1 in primary tumors promotes melanoma dissemination. *Clin Exp Metastasis.* 2014;31(7):749-760.
- [15] Kim JH, Rhee YY, Kim KJ, et al. Annexin A10 expression correlates with serrated pathway features in colorectal carcinoma with microsatellite instability. *APMIS.* 2014;122(12):1187-1195.

- [16] Yu SY, Li Y, Fan LQ, et al. Impact of Annexin A3 expression in gastric cancer cells. *Neoplasma*. 2014;61(3):257-264.
- [17] Jung KH, Lee JH, Park JW, et al. Annexin V imaging detects diabetes-accelerated apoptosis and monitors the efficacy of benfotiamine treatment in ischemic limbs of mice. *Mol Imaging*. 2014;13(3):1-7.
- [18] Sheu MJ, Li CF, Lin CY, et al. Overexpression of ANXA1 confers independent negative prognostic impact in rectal cancers receiving concurrent chemoradiotherapy. *Tumour Biol*. 2014;35(8):7755-7763.
- [19] Andey T, Marepally S, Patel A, et al. Cationic lipid guided short-hairpin RNA interference of annexin A2 attenuates tumor growth and metastasis in a mouse lung cancer stem cell model. *J Control Release*. 2014;184:67-78.
- [20] Shiraiishi T, Mori M, Tanaka S, et al. Identification of cystatin B in human esophageal carcinoma, using differential displays in which the gene expression is related to lymph-node metastasis. *Int J Cancer*. 1998;79(2):175-178.
- [21] 郭长青,王明荣,李继昌,等. Cystatin B基因在人食管癌中的表达[J]. *中华消化杂志*, 2001, 21(6):343-345.
- [22] Ritonja A, Machleidt W, Barrett AJ. Amino acid sequence of the intracellular cysteine proteinase inhibitor cystatin B from human liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 1985;131(3):1187-1192.
- [23] Abrahamson M, Barrett AJ, Salvesen G, et al. Isolation of six cysteine proteinase inhibitors from human urine. Their physicochemical and enzyme kinetic properties and concentrations in biological fluids. *J Biol Chem*. 1986;261(24):11282-11289.
- [24] Ray S, Lukyanov P, Ochieng J. Members of the cystatin superfamily interact with MMP-9 and protect it from autolytic degradation without affecting its gelatinolytic activities. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1652(2):91-102.
- [25] Harlozinska A. Progress in molecular mechanisms of tumor metastasis and angiogenesis. *Anticancer Res*. 2005;25(5):3327-3333.
- [26] Mistry SJ, Atweh GF. Role of stathmin in the regulation of the mitotic spindle: potential applications in cancer therapy. *Mt Sinai J Med*. 2002;69(5):299-304.
- [27] Madsen P, Rasmussen HH, Flint T, et al. Cloning, expression, and chromosome mapping of human galectin-7. *J Biol Chem*. 1995;270(11):5823-5829.
- [28] Demers M, Biron-Pain K, Hébert J, et al. Galectin-7 in lymphoma: elevated expression in human lymphoid malignancies and decreased lymphoma dissemination by antisense strategies in experimental model. *Cancer Res*. 2007;67(6):2824-2829.
- [29] Ryu JW, Kim HJ, Lee YS, et al. The proteomics approach to find biomarkers in gastric cancer. *J Korean Med Sci*. 2003;18(4):505-509.
- [30] Machado-Neto JA, Lazarini M, Favaro P, et al. ANKHD1 silencing inhibits Stathmin 1 activity, cell proliferation and migration of leukemia cells. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1853(3):583-593.
- [31] Berton S, Pellizzari I, Fabris L, et al. Genetic characterization of p27(kip1) and stathmin in controlling cell proliferation in vivo. *Cell Cycle*. 2014;13(19):3100-3011.
- [32] Nie W, Xu MD, Gan L, et al. Overexpression of stathmin 1 is a poor prognostic biomarker in non-small cell lung cancer. *Lab Invest*. 2015;95(1):56-64.
- [33] Feng T, Qiao G, Feng L, et al. Stathmin is key in reversion of doxorubicin resistance by arsenic trioxide in osteosarcoma cells. *Mol Med Rep*. 2014;10(6):2985-2992.
- [34] Zhao E, Amir M, Lin Y, et al. Stathmin mediates hepatocyte resistance to death from oxidative stress by down regulating JNK. *PLoS One*. 2014;9(10):e109750.
- [35] Schimmack S, Taylor A, Lawrence B, et al. Stathmin in pancreatic neuroendocrine neoplasms: a marker of proliferation and PI3K signaling. *Tumour Biol*. 2015;36(1):399-408.
- [36] Hemdan T, Lindén M, Lind SB, et al. The prognostic value and therapeutic target role of stathmin-1 in urinary bladder cancer. *Br J Cancer*. 2014;111(6):1180-1187.
- [37] Tullo A, D'Erchia AM, Sbisà E. Methods for screening tumors for p53 status and therapeutic exploitation. *Expert Rev Mol Diagn*. 2003;3(3):289-301.
- [38] Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000;408(6810):307-310.
- [39] Schunke D, Span P, Ronneburg H, et al. Cyclooxygenase-2 is a target gene of rho GDP dissociation inhibitor beta in breast cancer cells. *Cancer Res*. 2007;67(22):10694-702.
- [40] Zhang Y, Zhang B. D4-GDI, a Rho GTPase regulator, promotes breast cancer cell invasiveness. *Cancer Res*. 2006;66(11):5592-5598.
- [41] Cho HJ, Baek KE, Park SM, et al. RhoGDI2 expression is associated with tumor growth and malignant progression of gastric cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(8):2612-2619.
- [42] Gildea JJ, Seraj MJ, Oxford G, et al. RhoGDI2 is an invasion and metastasis suppressor gene in human cancer. *Cancer Res*. 2002;62(22):6418-6423.
- [43] Titus B, Frierson HF Jr, Conaway M, et al. Endothelin axis is a target of the lung metastasis suppressor gene RhoGDI2. *Cancer Res*. 2005;65(16):7320-7327.