

• 专 论 •

毒理基因组学在免疫毒理学研究中的应用

林 志¹, 黄 瑛¹, 张 颀¹, 杨艳伟¹, 吕建军¹, 屈 哲¹, 霍桂桃¹, 孙建宁², 李 波^{1*}

1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100176

2. 北京中医药大学, 北京 100029

摘 要: 毒理基因组学是利用 DNA 微阵列技术, 研究化合物作用于机体后的基因变化, 将组学技术与传统毒理学及组织病理学相结合, 评价和预测化合物的毒性的一门学科。随着毒理基因组学的广泛应用, 免疫毒理学领域也开始利用基因表达谱来分析化合物的免疫毒性。目前认为免疫毒理基因组学可能在下述 3 个方面具有较高的应用价值, 即免疫毒性物质的筛选、免疫毒性作用机制的研究以及免疫毒性风险评估。现围绕这 3 个方面, 对毒理基因组学在免疫毒理学领域中的应用进行阐述。

关键词: 毒理基因组; 免疫毒理学; 药物安全; 风险评估

中图分类号: R99 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2013)05-0321-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2013.05.001

Application of toxicogenomics in immune toxicology

LIN Zhi¹, HUANG Ying¹, ZHANG Di¹, YANG Yan-wei¹, LV Jiang-jun¹, QU Zhe¹, HUO Gui-tao¹,
SUN Jian-ning², LI Bo¹

1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Toxicogenomics is the subject that researches on the genetic changes by using DNA microarray technology after the compounds acting on the body. It combines omics technologies with conventional toxicology and histopathology in order to evaluate and predict the toxicity of a compound. With the wide application of toxicogenomics, it begins to analyze the immunotoxicity of compounds by using gene expression profiling in immunotoxicity. Currently, scientists believe that the immunotoxicogenomics may have higher value in the following three areas, immunotoxicity screening substances, immune mechanisms of toxicity, and immunotoxicity risk assessment. Therefore, it was discussed in these three aspects of application of immune toxicology in this paper.

Key words: toxicogenomics; immunotoxicity; drug safety; risk assessment

毒理学是研究毒物与机体相互作用的一门学科, 包括毒物对机体的损伤和机体对毒物的防御。随着分子生物学技术的蓬勃发展, 尤其是 DNA 微阵列技术的问世, 将毒理学的理论和技术发展带入了一个崭新的领域, 即毒理基因组学时代^[1]。毒理基因组学广泛的定义是将组学技术(转录组学、蛋白组学以及代谢组学)与传统毒理学及组织病理学终点相结合, 研究基因结构、变化与外来化合物之间的关系, 评价和预测受试物毒性的一门学科^[2-5]。

2000 年美国国家环境卫生科学研究所(National Institute of Environmental Health, NIEH)

成立了国家毒理基因组学研究中心(National Center for Toxicogenomental Health, NCTH), 专门开展毒理基因组学研究。2003 年, NCTH 开发了第 1 个毒理基因组学智能库, 提出了系统毒理学的概念。系统毒理学描述了利用毒理基因组学技术评估生物系统, 涵盖了毒物对生物系统的作用, 大分子物质的协同定位和协同表达的交互作用, 以及正常或异常状态下细胞、组织、器官及机体的分子表达的变化^[6]。

基因矩阵包括基因芯片和 DNA 芯片, 这已成为研究基因组学的中心平台。科研工作者通过构建的毒性基因矩阵, 定量分析毒物相关基因的转录序

收稿日期: 2013-06-17

基金项目: 国家“重大新药创新”科技重大专项-药物安全评价技术平台(2012ZX09302001)

作者简介: 林 志(1977—), 女, 副研究员, 主要从事药物临床前安全性评价。Tel: (010)67872233-8210 E-mail: linzhi@nicbpb.org.cn

*通信作者 李 波, 男, 研究员。研究方向为药物临床前安全性评价。Tel: (010)67095297 E-mail: libo@nicbpb.org.cn

列及转录活性。毒理基因矩阵又分为诱导型矩阵和演绎型矩阵。诱导型矩阵中含有大量的核苷酸探针,适用于寻找新的毒性基因,但是必须收集大量的基因表达谱,与毒性终点的数据进行相关性分析^[7]。而演绎型矩阵仅含数量有限的核苷酸探针,因此不能发现新基因,但它的优势是比较灵活,适用于进行目的明确的研究,即只需要进行少量基因表达和基因序列的数据分析、处理等^[8]。

目前毒理基因组的应用主要包括以下几个方面^[9-11]: (1) 阐明毒性改变的原理及作用机制; (2) 鉴定新的治疗靶点的特征, 预测可能存在的与药理学相关的毒性; (3) 筛选敏感的生物标志物^[12]; (4) 化合物安全性预测^[13]; (5) 动物毒性试验结果外推; (6) 人体暴露评价以及混合物的暴露情况研究。毒性基因的调控表达具有适应性和双向性^[14], 即当刺激强度低于最大诱导的暴露水平时, 基因表达强度可持续增强, 为适应性反应; 但遭受到等于或大于最大诱导的暴露水平时, 细胞不能抵抗刺激而出现损伤, 为损伤性反应。双向反应性基因存在两种功能状态, 即“开或关”的状态。这类基因多为细胞周期关键点的调控基因, 其激活常由磷酸化的特征而决定。

随着基因组学技术成功地应用于毒理学研究, 免疫毒理学领域也开始利用基因/蛋白表达谱来分析化合物的免疫毒性。免疫毒理基因组学主要利用基因组学技术来实现下述3个方面目的: (1) 替代或补充现有的免疫毒性筛选程序; (2) 了解和熟悉免疫毒性作用的方式或机制; (3) 为免疫毒性危害识别或危险评估提供数据。因此, 本文将就毒理基因组学在免疫毒物的筛选、毒性机制研究、危险评估的研究进展进行阐述。

1 免疫毒性物质的筛选

免疫毒性筛选包括通过构效关系或生物学测定分析, 比较微阵列结果, 以确定化合物是否具有危害性; 结合群体暴露评价基因数据或者跨物种进行基因数据的比较, 对化合物进行风险特征描述。1999年国际生命科学学会与健康和环境科学研究所(HESI)基因组学委员会主持开展了多项研究, 为免疫毒理学家提供了研究的模板。国际生命科学学会建议可以通过平台对化合物的免疫应答确定相应的生物学通路。他们认为直接比较基因是困难的, 单独的基因数据是不充足的, 基因数据必须与表型标记相结合。尽管人们普遍认为免疫功能的启动缺

乏明确的触发器, 但是在其他器官系统中识别甚至描述毒物的表征特点可采用基因表达谱^[15]。免疫毒理学家希望通过基因表达谱的分析, 探寻化合物诱导的免疫毒性模式。暴露在同样的毒物下, 机体可能出现相同的毒理终点, 同样地也可能出现类似的基因谱变化, 在同一毒性终点出现的基因表达谱有望成为新的生物标志物, 以帮助预测特殊的毒性。学术界普遍认为虽然免疫毒性最终基因芯片结果能从急性短期的免疫毒性实验中获得, 但是急性的高剂量暴露还会产生一般性的毒性表现, 因此一般性毒性所引起的基因谱的变化可能会干扰数据的分析和解释。在最大耐受剂量下以及无毒副作用剂量下, 采用基因芯片技术筛选免疫毒性生物标志物需要采用多个剂量水平和时间点的设定, 这样才能有效地区别特殊毒性和一般毒性以及毒性损伤改变和适应性改变。到目前为止, 只有少数实验室系统地研究基因表达作为筛选免疫毒性的工具。

1.1 应用实例

研究者以检测一些重要的免疫毒性物质如地塞米松、2, 3, 7, 8-四氯二苯并二噁英、环胞素A和环磷酸胺等, 发现B6C3F1小鼠的脾脏和胸腺出现了基因表达谱的变化, 这些基因表达的变化是与免疫功能及已知的作用机制密切联系的^[16]。动物给药5d, 提取核糖核酸, 用Illumina Sentrix Array Matrix芯片进行分析。结果显示上调基因包括载脂蛋白e、 γ -干扰素、半胱天冬酶-1、前B细胞促进因子1、诱导蛋白16和淋巴细胞抗原6a, 下调的基因包括T细胞转录因子、细胞周期调节蛋白D3、T细胞活化因子、细胞周期素依赖性激酶2(CDK2)和 γ -干扰素受体。这些基因表达的变化与免疫系统的紊乱是相关联的, 也就是说不同的基因谱是与特定的细胞靶位及作用方式密切相关的。该实验的设计可以作为一种典范推广。

化合物诱导的免疫毒性反应最常见的是过敏反应。Ryan等^[17]采用强致敏剂或激活剂作用于细胞, 检测细胞内基因的变化。结果显示二硝基硫代苯激活外周血单个核细胞(PBMC)中的CD14⁺树突状细胞, 通过基因芯片技术检测到29个与致敏物相关的候选靶基因。有研究表明硫酸镍等接触性致敏剂也可诱导人树突状细胞基因出现变化^[18]。进一步研究采用了不同程度的、由弱至强的致敏剂刺激PBMC细胞, 检测并区分上述基因表达的优先次序, 精简与致敏反应相关的基因群(genes list)。最终获

得与致敏相关的基因,包括细胞因子和化学介质(如 CCL23 等),以及细胞表面受体/膜蛋白(如 NOTCH3 和 CD1E)。最终区别激活剂和致敏化合物的方法仍需要更多的验证,包括动物实验等^[19]。

Hochstenbach 等^[20]研究人外周血单核细胞暴露在多种免疫毒性化合物后全基因表达谱的变化,包括二羟基-壬烯醛、黄曲霉素 B1 (aflatoxin B1)、苯并芘、脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (deoxynivalenol)、乙醇、丙二醛、多氯联苯 153 (polychlorinated biphenyl 153)、四氯-*p*-二噁英。采用安捷伦寡核苷酸芯片和 Genedata Expressionist 软件进行全基因谱分析,最后获得了 48 个基因可作为基因群标志物,区别免疫毒性和非免疫毒性物质。

1.2 实验设计要求

最初的毒理基因组实验设计必须具有多个剂量,包括与周围环境相关的最低剂量。此外,实验设计还应该具有早期和晚期多个时间点的设定。时间效应和剂量效应相结合才能更好地评价基因变化与免疫功能变化表征之间的关联性^[21]。从动物使用的角度而言,采用标准毒理学实验设计中的组织进行基因筛选是非常有吸引力的。但是,没有证据表明基因组学研究相对传统的免疫毒性评价方法节省成本,基因组学研究反而是比较昂贵的。在进行基因组学数据库的建立和验证时,必须设定阳性和阴性对照。为了确保数据可用于风险评估,应该有一个正式的关于体内和体外实验的比较性研究^[22],即采用多种啮齿类动物以及啮齿类动物和人的细胞株。在决定体内或体外实验时,值得注意的是体外细胞的去分化,并且失去了与相邻细胞类型间的相互作用,而这恰是诱导免疫毒性的重要原因。但是,在其他一些器官系统中以基因组学为基础的毒性数据提示了某些化合物的特征可以由主要暴露细胞的转录谱变化来解释。

通常候选基因确定后,理想的筛选方法需要对动物和人群进行比较验证,即直接比较实验动物和暴露人群中所获数据之间的差异性。有研究采用基因组学作为筛选工具,对接触焊接烟的工人和未接触的人群外周血单核细胞进行基因芯片分析,筛选出差异基因。所获取的基因群与炎症和免疫应答相关,这提示毒物对呼吸系统的影响会引起机体的系统免疫应答,因此通过外周血 PBMC 基因表达的改变可以评估呼吸毒性。目前,这些研究最重要的一步就是将免疫功能改变与基因表达变化相结合。将

来的研究需要对各类的免疫抑制物免疫功能的改变与表达基因谱的研究相结合,以便更好地认识基因表达谱预测免疫功能变化的价值。这对于免疫毒理基因组学成为有效的预测工具非常重要。

此外,选择合适的测试对象在免疫毒理基因组学研究中同样重要。McLaren 等^[23]研究比较了个体自身的不同 T 细胞亚型(CD4⁺、CD8⁺T 细胞)和 PBMC 在受到抗原刺激后基因表达谱的变化。结果显示给予白色念珠菌后,HIV 阴性血样中仅有一类细胞中存在 136 个基因变化,而 3 类细胞均出现变化的仅有 26 个基因。这就提示大量差异基因表达是依赖于受检的细胞类型。PBMC 出现的基因表达谱的变化不能代表 T 细胞亚群基因的变化。研究还发现尽管在 PBMC 中单核细胞趋化蛋白 1 (MCP-1) 基因表达增高明显,但是 CD4⁺T 细胞和 CD8⁺T 细胞均未见该基因的变化。因此,尽管在混合细胞中检测出差异表达的基因,但是不能确定究竟是哪一类细胞的基因变化^[24]。总之,在微阵列实验设计时选用何种物质或样本是非常关键的。

2 免疫毒性作用方式和机制的研究

微阵列技术的优势在于允许对化合物作用机制细节并不清楚的情况下,跳过毒性反应复杂的过程,直接从众多基因中比较基因表达的异同,从而寻找不同时间点和不同剂量水平下共同表达的基因谱(基因轮廓图)。因此,基因组学技术具有传统毒理学实验不可比拟的优势,其能在化合物毒性作用机制不明的情况下,通过差异基因表达的功能特点,推测可能存在的作用方式。区别和认识免疫系统的复杂作用机制的基因可以是数百个,也可以是更多的基因群。通常认为不能仅关注某些基因,而应该在通路水平进行研究和分析。但是,采用这种策略,可能会去掉一些非特异性免疫功能相关的基因,如凋亡、坏死和急性期应答,而这些变化可能通过非特异性的途径最终影响免疫功能。

Hutton 等^[25]发现检测受刺激小鼠和未受刺激小鼠的免疫组织(脾脏、胸腺、淋巴结和外周血单核细胞)中表达的基因及顺式调控元件(regulatory cis-elements),通过聚类分析 8 734 个表达序列,发现淋巴组织中 680 个基因过度表达,减去在非淋巴组织中高表达的基因后,获得 360 个在淋巴组织中高表达的基因。这些基因分别与受体或细胞信号传导,免疫或防御应答,转运、黏附趋化或细胞凋亡等有关。

通常重要基因表达的变化显示了常见的炎症作用机制,并且这些变化可以用于诱发哮喘化合物的筛选。但是,多重效应途径可能是导致最终表型或症状的主要原因。比如,尽管过敏物质如卵清蛋白(OVA)或偏苯三酸酐(TMA)均可诱发类似的哮喘症状,但是在哮喘的效应阶段它们引起了独特的基因激活和作用途径^[26-28]。研究结果显示 OVA 主要通过气道重建模式诱发哮喘,而 TMA 则引起支气管扩张和产生活性氮。Saless 等^[29]在研究六氯苯(HCB)对 BN 大鼠的免疫毒性时发现动物肝脏、脾脏和淋巴结变大,血清中免疫球蛋白 IgM、IgG 和 IgE 均升高,并且出现皮肤和肺部的炎症。然而,HCB 诱导的免疫毒性的机制并不清楚。通过 Affymetrix 微阵列芯片分析,发现在脾脏和淋巴结中具有显著性差异表达的基因主要涉及药物代谢和急性反应期中的粒细胞、化学介质、细胞因子和免疫球蛋白等。在肝脏中主要变化的基因涉及雌激素和卟啉代谢以及免疫应答功能。在血细胞中,显示编码 MHC II 类分子和 T 细胞表面分子的基因受到影响。芯片技术提供了一个很好的进行毒理机制的研究手段。研究中发现的前炎症因子、化学介质、抗氧化剂以及急性反应蛋白相关基因的变化都有助于认识和了解 HCB 的毒性作用机制。

最后,基因组学技术应用于免疫毒性机制的研究必须将基因组数据分析与功能实验的结果相结合。研究者认为基因分析的组织应该来源于进行的功能性免疫毒性实验,这样可以在同一动物中分析基因表达的变化和功能的改变。

3 风险评估的应用

在基因数据被接受参与免疫毒性风险评估之前,不能确定的问题是在免疫应答中动物的相对较少、具有统计学差异的基因改变是否与人类的免疫毒性反应相关。除了观察体内的变化外,必须考虑大量基因或蛋白的相对微小的变化时,危险性评估方式的复杂性可能被过分地放大。至今为止,免疫毒性危险性评估并没有采用微阵列数据。但是,有时药剂制品的评价中毒理基因组数据会和其他数据一起被提交。常规毒性实验不涵盖毒理基因组数据。曾在乙草胺诱发鼻嗅上皮肿瘤的致癌性风险评估中,其毒理基因作为一个份量一般的农药注册申请数据被提交^[30]。因此,利用基因组分析的阐述药物作用方式的风险特征仅仅在区别致癌性还是非致癌性的实例中使用。鼻腔滴入甲醛和戊二醛时,F344

大鼠会出现增生、鳞状上皮化生、炎症和凋亡小体等。但是在甲醛实验中,更多的 DNA 修复相关基因和较少量的凋亡相关基因在鼻腔上皮细胞中表达,这与戊二醛正好相反^[31-32]。

4 小结

基因芯片分析所获得的表达谱能反映机体功能实验中的变化或结果,如局部淋巴结分析(local lymph node assay, LLNA)预测接触性皮炎和抗体应答,自然杀伤细胞分析,细胞表面标志物,以及组织病理学预测免疫抑制等。为了澄清基因表达于功能终点变化的关联性,最重要的是选用合适的化合物进行评价,并且选用合适的细胞提取 mRNA。需要建立基因组数据与传统的免疫毒性结果之间的关联性。目前,基因组学技术已经成功用于研究化合物的作用机制,但该技术并没有作为免疫抑制剂的筛选工具。自身免疫由于本身的复杂性,也还没有人采用组学技术分析和解释其作用机制。

各种发表的免疫毒性研究均认为微阵列分析已经成为一种非常有用的工具,可以探寻免疫功能变化的主要信号通路。此外,质量保证和合适的统计学分析是获得可重复、可信数据的关键。建立公开有用的免疫毒性基因组学数据库对于推动科学发展非常重要。该数据库应该包括免疫毒性研究实验中的多个免疫组织的微阵列分析,传统的毒性检测终点,基因表达变化与功能测定数据的关联性等。同样重要的是,结合免疫系统中免疫和过敏的评价,评估一组已知的免疫毒性阳性剂和阴性剂,以在功能上区别适应性变化还是真正的毒性反应。目前美国药品食品监督管理局(FDA)在厂家自愿的基础上接受毒理基因组数据,用以更好地评价药物的毒性。FDA 还使用毒理基因组信息标示某些抗肿瘤药的变化。对于免疫毒性,研究者正在探索来源于树突状细胞的免疫毒性基因组数据,以期能成为过敏性接触性皮炎的风险评估策略之一^[33]。基因芯片技术有望成为一种工具,以确定动物模型中调控化合物毒性的某一特定通路是否在人类机体中存在。

参考文献

- [1] Carlson E A, Silkworth J B. Toxicogenomics in human health risk assessment [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, 236(2): 254-260.
- [2] Currie R A. Toxicogenomics: the challenges and opportunities to identify biomarkers, signatures and thresholds to support mode-of-action [J]. *Mutat Res*,

- 2012, 746(2): 97-103.
- [3] Kerns R T, Bushel P R. The impact of classification of interest on predictive toxicogenomics [J]. *Front Genet*, 2012, 3: 14-19.
- [4] Ruden D M. Frontiers in toxicogenomics-the grand challenge: to understand how the genome and epigenome interact with the toxic environment [J]. *Front Genet*, 2011, 2: 12. doi: 10.3389/fgene.2011.00012.
- [5] Ferrer-Dufol A, Menao-Guillen S. Toxicogenomics and clinical toxicology: an example of the connection between basic and applied sciences [J]. *Toxicol Lett*, 2009, 186(1): 2-8.
- [6] Waters M D, Fostel J M. Toxicogenomics and systems toxicology: aims and prospects [J]. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(12): 936-948.
- [7] Vass L, Kelemen J Z, Feher L Z, *et al.* Toxicogenomics screening of small molecules using high-density, nanocapillary real-time PCR [J]. *Int J Mol Med*, 2009, 23(1): 65-74.
- [8] 岑小波, 王 莉. 毒理基因组学及其在化合物安全性评价中的应用展望 [J]. *卫生研究*, 2001(4): 249-252.
- [9] 潘东升, 范玉明, 李 波. 毒理基因组学在预测肝、肾毒性中的应用现状及研究进展 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2012(3): 383-385.
- [10] Mei N, Fuscoe J C, Lobenhofer E K, *et al.* Application of microarray-based analysis of gene expression in the field of toxicogenomics [J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 597: 227-241. doi: 10.1007/978-1-60327-389-3_16.
- [11] Wills Q, Mitchell C. Toxicogenomics in drug discovery and development — making an impact [J]. *Altern Lab Anim*, 2009, 37(Suppl 1): 33-37.
- [12] Currie R A. Toxicogenomics: the challenges and opportunities to identify biomarkers, signatures and thresholds to support mode-of-action [J]. *Mutat Res*, 2012, 746(2): 97-103.
- [13] Daston G P, Naciff J M. Predicting developmental toxicity through toxicogenomics [J]. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2010, 90(2): 110-117.
- [14] Choudhuri S. Looking back to the future: from the development of the gene concept to toxicogenomics [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2009, 19(4): 263-277.
- [15] Piccotti J R, Lebrech H N, Evans E, *et al.* Summary of a workshop on nonclinical and clinical immunotoxicity assessment of immunomodulatory drugs [J]. *J Immunotoxicol*, 2009, 6(1): 1-10.
- [16] 孟谦谦, 童 建. 免疫毒理基因组学 [J]. *毒理学杂志*, 2009(1): 82-85.
- [17] Ryan C A, Gildea L A, Hulette B C, *et al.* Gene expression changes in peripheral blood-derived dendritic cells following exposure to a contact allergen [J]. *Toxicol Lett*, 2004, 150(3): 301-316.
- [18] Schoeters E, Nuijten J M, van Den Heuvel R L, *et al.* Gene expression signatures in CD34⁺-progenitor-derived dendritic cells exposed to the chemical contact allergen nickel sulfate [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2006, 216(1): 131-149.
- [19] Gildea L A, Ryan C A, Foertsch L M, *et al.* Identification of gene expression changes induced by chemical allergens in dendritic cells: opportunities for skin sensitization testing [J]. *J Invest Dermatol*, 2006, 126(8): 1813-1822.
- [20] Hochstenbach K, van Leeuwen D M, Gmuender H, *et al.* Transcriptomic profile indicative of immunotoxic exposure: *in vitro* studies in peripheral blood mononuclear cells [J]. *Toxicol Sci*, 2010, 118(1): 19-30.
- [21] Beernaert H, Vanherle A M, Bertrand S. Critical aspects in implementing the OECD monograph No. 14 “the application of the principles of GLP to *in vitro* studies” [J]. *Ann Ist Super Sanita*, 2008, 44(4): 348-356.
- [22] Scott D J, Devonshire A S, Adeleye Y A, *et al.* Inter- and intra-laboratory study to determine the reproducibility of toxicogenomics datasets [J]. *Toxicology*, 2011, 290(1): 50-58.
- [23] McLaren P J, Mayne M, Rosser S, *et al.* Antigen-specific gene expression profiles of peripheral blood mononuclear cells do not reflect those of T-lymphocyte subsets [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 2004, 11(5): 977-982.
- [24] Julkunen I, Sareneva T, Pirhonen J, *et al.* Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2001, 12(2/3): 171-180.
- [25] Hutton J J, Jegga A G, Kong S, *et al.* Microarray and comparative genomics-based identification of genes and gene regulatory regions of the mouse immune system [J]. *BMC Genomics*, 2004, 5(1): 82-97.
- [26] Hirakawa I, Miyagawa S, Katsu Y, *et al.* Gene expression profiles in the testis associated with testis-ova in adult Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to 17 α -ethinylestradiol [J]. *Chemosphere*, 2012, 87(7): 668-674.
- [27] Veeck J, Dahl E. RNA expression analysis on formalin-fixed paraffin-embedded tissues in TMA format by RNA in situ hybridization [J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 664: 135-150.
- [28] Schlomm T, Chun F, Erbersdobler A. From gene to clinic: TMA-based clinical validation of molecular markers in prostate cancer [J]. *Methods Mol Biol*, 2010, 664: 177-189. doi: 10.1007/978-1-60761-806-5_17.
- [29] Saless N, Litscher S J, Vanderby R, *et al.* Linkage

- mapping of principal components for femoral biomechanical performance in a reciprocal HCB-8 x HCB-23 intercross [J]. *Bone*, 2011, 48(3): 647-653.
- [30] Luebke R W, Holsapple M P, Ladics G S, *et al.* Immunotoxicogenomics: the potential of genomics technology in the immunotoxicity risk assessment process [J]. *Toxicol Sci*, 2006, 94(1): 22-27.
- [31] Daston G P. Gene expression, dose-response, and phenotypic anchoring: applications for toxicogenomics in risk assessment [J]. *Toxicol Sci*, 2008, 105(2): 233-234.
- [32] Sexton K, Balharry D, Berube K A. Genomic biomarkers of pulmonary exposure to tobacco smoke components [J]. *Pharmacogenet Genomics*, 2008, 18(10): 853-860.
- [33] Ryan C A, Gildea L A, Hulette B C, *et al.* Gene expression changes in peripheral blood-dendritic cells following exposure to a contact allergen [J]. *Toxicol Lett*, 2004, 150(3): 301-316.