

[文章编号] 1007-385X(2004)04-0299-03

组织芯片在肿瘤研究中的应用进展

蒋平 综述; 向正华, 焦炳华 审阅(第二军医大学基础部生物化学与分子生物学教研室, 上海 200433)

[摘要] 组织芯片是近年发展起来的一种生物芯片技术。由于它能对组织中基因、蛋白质的表达情况进行高通量、大样本的快速分析,组织芯片在组织学,特别是肿瘤研究中得到了广泛的应用。应用组织芯片,科研人员可以更加快速而广泛地检测生物标记物的特性,加速对肿瘤发生、发展过程的认识;确认目标分子同临床病理学参数之间的关系,为癌症的预后及治疗提供了有价值的信息;对肿瘤发病机理中感兴趣的基因进行研究;此外,组织芯片这种高通量研究技术促进人们高效地处理应用它得到的生物信息。

[关键词] 组织芯片; 肿瘤; 蛋白质

[文献标识码] R730.4; Q7 [中图分类号] A

1 组织芯片

组织芯片是指在一张普通载玻片上,按照设计整齐排布几十到几千个微小的组织样本点阵;在一张玻片上进行一次实验,即可完成对所有组织样本的原位分析检测的一项高通量生物芯片技术。自1998年由Kononen等^[1]发明至今,短短几年时间,组织芯片技术被引入实验室,帮助我们在短时间内分析基因组、RNA组、蛋白质组的表达和变化。

2 组织芯片技术在肿瘤研究中的应用

随着后基因组时代的到来,人们对大量靶分子进行分析以了解其在肿瘤诊断、治疗及预后方面的价值。传统的分子病理学方法费时费力,且需大量组织,使得可被检测的靶分子数目受到限制。

高通量的组织芯片技术可以很好地解决上述难题:一张组织芯片上可以排列多达2000个组织标本,在一张芯片上进行一次实验即可完成对所有标本的检测,其科学价值被越来越多的研究所证实。而且,它可在组织学技术,大型组织库建设及病理教学中形成质量控制,大大简化了基因在组织中表达的分析过程。因此,组织芯片促进了高通量分析大样本组织中DNA、RNA及蛋白质的表达。

目前,组织芯片技术被广泛用于肿瘤研究,已涉及到包括神经胶质瘤、前列腺癌、乳腺癌、膀胱癌、肾细胞癌、肺癌在内的多种肿瘤,且应用范围在不断扩大。组织芯片用于肿瘤研究主要有以下几个方面:

2.1 用于肿瘤分子分型

在肿瘤的生物发生、发展过程中,很多基因被认为有作用,为评估这些新“老”癌基因的临床意义,须对大量肿瘤标本进行检测。采用组织芯片方法,可在几小时内完成几千个样本的DNA、RNA、蛋白质水平的原位分析。许多研究都表明:这些少量组织样品都很好的代表了其供体组织。目前,已经有多种不同类型的组织芯片用于肿瘤研究,包括异种肿瘤芯片、癌增殖芯片及预后芯片。异种组织芯片及组织芯片

同基因芯片等技术的联合使用可以更加快速而广泛地检测生物标记物的特性,加速对肿瘤发生、发展过程的认识。

Zellweger^[2]制备了551位前列腺癌病人的组织芯片,并对Ki67、Bcl-2、p53、CD-10和Syndecan-1等与凋亡、增殖有关的指标进行检测。观测到Ki67、LI、Bcl-2、Syndecan-1的高表达同前列腺癌的早期复发及其特异性增殖相关;P53同前列腺的不良生长有关;Bcl-2预示前列腺癌的早期复发。当使用激素辅助疗法使Bcl-2过表达时,会抑制Ki67、LI和CD-10的表达,但不影响其他标记物的表达。这些结果证实了Gleason分级和Ki67、LI等指标在前列腺癌分型中的指示作用。

头颈部初级鳞状细胞癌(HNSCC)的组织芯片可进行遗传学畸变的检测。通过检测几种癌蛋白的表达,发现HNSCC是异质性肿瘤群体,可以呈现癌基因多样的表达:c-myc在早期咽喉部肿瘤中高表达,而在早期口腔癌中无表达;erbB1和erbB2在口腔癌中过表达;cyclin D1在IV期肿瘤中高表达。这些信息均对HNSCC的病理分型有帮助^[3]。

根据基因表达谱可将B细胞淋巴瘤分为3种类型:原始B细胞(GBB)、活化的B细胞(ABC)和一类称为“第三型”的新类型。CD44变异亚型(CD44v)同该种癌症的关系经60点的组织芯片分析得出:CD44v6有助于淋巴瘤的扩散,且主要在ABC型淋巴瘤中表达,而在另两种类型中不表达;在非GBB型中,Bcl-2与cyclinD2是相互排斥的。这同基因芯片的结果高度一致,并为B细胞淋巴瘤的分型提供很有价值的信息^[4]。

常规乳腺癌的组织病理学分型基于其恶性程度,现在人们可以用乳腺癌组织芯片进行乳腺癌的分子分型。用3种标记蛋白进行免疫组化,发现了不同的乳腺癌亚群。而这些亚群用单一的生物标记物均无法检测到它们的分类。这种分型同基因芯片分析的结果相似。因此,乳腺癌分子表达谱可以将肿瘤划分为临床亚群和与生物学相关的亚群^[5]。HER-2/neu癌基因与它的受体蛋白的表达都被用于提示乳腺癌对Herceptin的治疗性反应,在组织芯片和传统病理切片上均进行FISH与免疫组化的实验,得到的结果很接近:不论HER-2/

neu 基因,还是 Herceptin 蛋白,它们的表达均同乳腺癌发展程度,雌激素水平及黄体素受体水平有很强相关性^[6]。

在前列腺组织芯片中,同时进行 34- β -E12 及 P63 的免疫组化,对于诊断细胞标记物缺失引起的前列腺癌很有帮助^[7]。E-钙黏素是一种钙依赖细胞黏附分子,其表达同前列腺癌的发生相关。以往对 E-钙黏素的研究存在争议:一些研究表明 E-钙黏素的表达是肿瘤生长和转移的表现,而其他研究并未揭示此联系。组织芯片的研究显示,临床 Gleason 分级高同 PSA(前列腺特异抗原)失效有关,同肿瘤病情发展有关^[8]。

2.2 用于肿瘤的预后评价

科学家借助组织芯片这一强大工具对乳腺癌进行神经内分泌方面指标的检测,确认它同临床病理学参数之间的关系。检测了含 334 个乳腺癌病人标本的组织芯片中 3 个标记物:突触素(SYN)、嗜铬粒蛋白(CHA)和神经特异性烯醇化酶(NSE),共计有 19.5% 的样本有阳性结果。结果显示神经内分泌(NE)表型与肿瘤形态不相关,突触素染色与恶性肿瘤有微弱相关^[9]。借助组织芯片,科研人员找到 sydecan-1——一个新的预后分子和一个雄激素依赖的 CD-10 表达的调节证据,NSEC(神经特异性烯醇化酶)的表达与特定疾病和整体生存在单一参数分析中呈现相关性,并证明 SYN(突触素)和 CHA(嗜铬粒蛋白 A)的表达与多种神经内分泌标记物的表达均同预后无关。COX-2 的表达同高侵袭性乳腺癌相关,与雌激素和黄体素受体之间有逆向关系,为乳腺癌的预后及治疗提供了有价值的信息^[10]。

甲状腺转录因子(TTF-1),一个包含同源结构的转录因子,在肺部发育、细胞生长和分化过程中起到关键作用。为评价 TTF-1 在肺癌预后中的作用,140 例 NSCLCS(非小细胞性肺癌)标本用组织芯片进行研究:TTF-1 表达与肿瘤分级程度都同存活时间相关。在多参数分析中,TTF-1 呈阳性的病人预后情况好,整体存活时间延长 57.3 个月;TTF-1 主要在腺癌中表达,其表达缺失会伴随 NSCLCS 的侵袭^[11]。在肺部鳞状细胞癌中,TAA(MAGE 家族中肿瘤相关抗原)的表达同不良预后相关,TAA 阳性病人最好应得到即早的免疫治疗^[12]。

2.3 用于肿瘤的致病机理研究

组织芯片的样本不仅可以来自肿瘤组织,还可以来源于细胞系,血清学组织。除了特定肿瘤的应用外,组织芯片还可以用于大范围的分子流行病学研究。比如,我们感兴趣的基因可以在多组织的组织芯片中分析,包括从正常组织到肿瘤组织。一旦肿瘤种类确定了,其中某个分子的变化便会引起生物学的作用。这种分子改变的临床重要性便会有相应的组织芯片进行研究,因此,组织芯片技术可支持小型的高通量分子流行病学研究。

为探讨前列腺癌增殖的分子机理,Mousses 等^[13]制备了处于疾病生长不同阶段的前列腺组织芯片,来验证由前列腺癌的 cDNA 芯片所找到的候选靶基因。他们发现 S100P 基因(编码一个钙调分子)与老化缺失及肿瘤的生长有关,Crystallin mu(CRYM)和 LM04 是 2 个在肿瘤生长中起负调节功能的

基因。中性氨基酸转运载体 ASCT2 往往伴随着恶性肿瘤代谢速度的加快,在肿瘤增殖、生长及病人存活方面的影响尚不明了。组织芯片研究表明:ASCT2 在恶性和良性前列腺肿瘤中,被用于谷胺酰的代谢,ASCT-2 呈阳性的前列腺癌似乎与过激生物行为有关,ASCT2 同肿瘤生长有关^[14]。

2.4 用于生物信息学的研究

组织芯片的高通量特点带来的是大量的信息,一张组织芯片中包含的数据往往多达上千个。如何高效的处理这些生物信息,科学研究迫切需要建立一个组织芯片数据交换处理库,使实验中收集到的所有数据处于一个统一的格式中。Michigan 大学的科学家为前列腺病人标本的组织芯片建立了数据库。其主要组成部分为:1)组织芯片数据库 2)组织芯片图片库 3)前列腺病理学和临床数据库。数据库中的信息共由 19 个组织芯片蜡块提供,包括 1 695 例正常前列腺,3 171 例前列腺癌,464 例前列腺上皮瘤和 121 例前列腺萎缩。该系统简化了数据分析的过程,提高了效率,降低了成本^[15]。

目前,有关组织芯片数据交换规范的蓝图已经被描绘出来了,美国病理信息协会(API)将会改进现在草拟的数据交换规范,使之成为一个开放性的数据交流库,便于组织芯片技术的交流与推广^[16]。

3 前景与展望

肿瘤的发生是多种蛋白参与的复杂过程。目前肿瘤的治疗尚未取得突破的主要原因就是因为各种癌变细胞的生物学特性复杂以及肿瘤发生癌变的机制不清^[17]。

组织芯片具有高通量,大样本,省时快速等优点,利用这些优势可使肿瘤的分子诊断,预后判断,研发药物等相关领域的大规模研究成为可能。因此,通过组织芯片检测在肿瘤形成中差异表达的蛋白,不但可以从病理上寻找病因,同时也为早期诊断和预后判断提供依据,并针对肿瘤组织内特有的蛋白变异情况,探索新的治疗途径。

组织芯片是一门新兴技术,有待完善之处,如组织芯片仍以手工制作和人工判读为主,因此自动化制备技术的研发和自动阅读分析系统的建立对拓展组织芯片技术芯片应用领域的广度与深度^[18]。可喜的是,科研人员不断改进用于组织芯片的各种实验方法,使得检测更加灵敏,更适用于组织芯片。优化了原有的针对传统病理切片的 FISH 方法,并对卵巢癌中 BRCA1 蛋白进行检测,在已知 BRCA1 表达的细胞系和一些分散内皮卵巢癌,相邻不良区域和远癌区域样本的组织芯片上均进行了研究。在重度和轻度卵巢癌和相邻不良部位都检测到了有特异性的 BRCA1 的表达,而在传统病理切片上检测不到。同样的方法用于检测 HER-2 与 2NF-217 基因以及 17 号染色体着丝粒。改进后的新方法使阳性信号强度大幅度提高,并且使有可评估信号的组织样本增加了 3%。改进后的新技术杂交条件更加优化,产生了高质量的杂交信号,进一步完善了组织芯片技术^[19]。

组织芯片同其他分子生物学方法的结合将使人类找到更多的与肿瘤有关的基因,进而能够找到治疗肿瘤的靶基因

或其他分子标志物,在肿瘤的研究及治疗方面作出更多的工作^[20]。

【参考文献】

- [1] Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens [J]. *Nat Med*, 1998, 4(7): 844-847.
- [2] Zellweger T, Ninck C, Mirlacher M, *et al.* Tissue microarray analysis reveals prognostic significance of syndecan-1 expression in prostate cancer[J]. *Prostate*, 2003, 55(1): 20-29.
- [3] Freier K, Bosch FX, Flechtenmacher C, *et al.* Distinct site-specific oncoprotein overexpression in head and neck squamous cell carcinoma: A tissue microarray analysis[J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(5A): 3971-3977.
- [4] Tzankov A, Pehrs AC, Zimpfer A, *et al.* Prognostic significance of CD44 expression in diffuse large B cell lymphoma of activated and germinal centre B cell-like types: A tissue microarray analysis of 90 cases[J]. *J Clin Pathol*, 2003, 56(10): 747-752.
- [5] Callagy G, Cattaneo E, Daigo Y, *et al.* Molecular classification of breast carcinomas using tissue microarrays[J]. *Diagn Mol Pathol*, 2003, 12(1): 27-34.
- [6] Zhang D, Salto-Tellez M, Do E, *et al.* Evaluation of HER-2/neu oncogene status in breast tumors on tissue microarrays[J]. *Hum Pathol*, 2003, 34(4): 362-368.
- [7] Zhou M, Shah R, Shen R, *et al.* Basal cell cocktail (34betaE12 + p63) improves the detection of prostate basal cells[J]. *Am J Surg Pathol*, 2003, 27(3): 365-371.
- [8] Rubin MA, Mucci NR, Figurski J, *et al.* E-cadherin expression in prostate cancer: A broad survey using high-density tissue microarray technology[J]. *Hum Pathol*, 2001, 32(7): 690-697.
- [9] Makretsov N, Gilks CB, Coldman AJ, *et al.* Tissue microarray analysis of neuroendocrine differentiation and its prognostic significance in breast cancer[J]. *Hum Pathol*, 2003, 34(10): 1001-1008.
- [10] Wulfing P, Diallo R, Muller C, *et al.* Analysis of cyclooxygenase-2 expression in human breast cancer: High throughput tissue microarray analysis[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2003, 129(7): 375-382.

- [11] Tan D, Li Q, Deeb G, *et al.* Thyroid transcription factor-1 expression prevalence and its clinical implications in non-small cell lung cancer: A high-throughput tissue microarray and immunohistochemistry study[J]. *Hum Pathol*, 2003, 34(6): 597-604.
- [12] Bolli M, Kocher T, Adamina M, *et al.* Tissue microarray evaluation of Melanoma antigen E (MAGE) tumor-associated antigen expression: Potential indications for specific immunotherapy and prognostic relevance in squamous cell lung carcinoma[J]. *Ann Surg*, 2002, 236(6): 785-793.
- [13] Mousses S, Bubendorf L, Wagner U, *et al.* Clinical validation of candidate genes associated with prostate cancer progression in the CWR22 model system using tissue microarrays[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(5): 1256-1260.
- [14] Li R, Younes M, Frolov A, *et al.* Expression of neutral amino acid transporter ASCT2 in human prostate[J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(4): 3413-3418.
- [15] Manley S, Mucci NR, de Marzo AM, *et al.* Relational database structure to manage high-density tissue microarray data and images for pathology studies focusing on clinical outcome: The prostate specialized program of research excellence model[J]. *Am J Pathol*, 2001, 159(3): 837-843.
- [16] Berman JJ, Edgerton ME, Friedman BA. The tissue microarray data exchange specification: A community-based, open source tool for sharing tissue microarray data[J]. *BMC Med Inform Decis Mak*, 2003, 3(1): 5.
- [17] 姚天明, 韩冰. 生物芯片技术在肿瘤研究中的应用进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2002, 9(3): 227-228.
- [18] 李军, 刘镭. 组织芯片技术与肿瘤研究[J]. *肿瘤学杂志*, 2002, 8(6): 350-352.
- [19] Merselburger AS, Kuczyk MA, Serth J, *et al.* Limitations of tissue microarrays in the evaluation of focal alterations of bcl-2 and p53 in whole mount derived prostate tissues[J]. *Oncol Rep*, 2003, 10(1): 223-228.
- [20] Andersen CL, Hostetter G, Grigoryan A, *et al.* Improved procedure for fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays[J]. *Cytometry*, 2001, 45(2): 83-86.

【收稿日期】 2004-04-16

【修回日期】 2004-09-10

《中华现代眼科学杂志》《中华现代皮肤科学杂志》

《中华现代眼科学杂志》《中华现代皮肤科学杂志》为中华临床医学学会主办的医学专业学术刊物,月刊,具有 ISSN/CN 标准刊号。现已被中华首席医学网(www.shouxi.net),全文收录。国内外读者可以在网上免费阅读杂志全文。两刊贯彻党和国家的卫生工作方针政策,反映我国临床科研工作的重大进展,促进国内外学术交流、刊登眼科学、皮肤科学领域的科研成果和临床诊治经验、学术研究、技术改进、以及对临床有指导作用的专家评论,等等。

《中华现代眼科杂志》主要栏目:论著、综述、临床医学、中西医结合、中医中药(专科经方验方)、新技术新材料、专题讲座、技术与方法、学术动态、国外研究进展、病例报告、误诊分析、经验交流、流行病学与人群防治、基层园地、保健知识讲座、专科检查与临床、药物与临床、专科护理等。

《中华现代皮肤科学杂志》主要栏目:论著、综述、基础研究、临床与病理、美容外科、临床医学、中西医结合、中医中药、药物与临床、检验与临床、经验交流、病例报告、误诊分析、技术改进、预防医学、临床护理、医学教育、调查报告、会议纪要等。

两刊发表周期短,免收审稿费。论文发表后颁发论文证书。对省/部级以上部门科研基金资助项目的论文优先刊登。欢迎投稿。

来稿请寄:北京 100035-55 信箱编辑部收(来稿请所投杂志名称)

邮编:100035;电话:010-62245829;62242528

电子邮件:《中华现代眼科学杂志》yanxue@sohu.com;《中华现代皮肤科学杂志》ifuke@sohu.com