

·学科进展·

一种新的生物芯片——组织芯片

杨 军 张明娟

(西安交通大学第二医院病理科,西安 710004)

[摘 要] 重点介绍了组织芯片技术的发展并探讨其在病理组织学研究中的应用。

[关键词] 组织芯片,组织微阵列,生物芯片,病理组织学

生物芯片技术是20世纪80年代兴起的一项生物学研究技术,一般包括基因芯片和蛋白芯片。1998年由Kononen等人^[1]报道了一种组织微阵列(tissue microarrays)技术,也称组织芯片(tissue chip)技术,是生物芯片的一个新类型。本文主要对其发展和应用予以介绍。

1 组织芯片的研究进展

医学乃至整个生命科学同时向微观和宏观两个方向深入发展。组织学和病理组织学是支撑整个医学发展的基础之一。是联系微观世界和宏观世界、基础医学和临床医学的桥梁学科,其研究方法是生命科学研究的重要手段。随着人类基因组计划的完成并进入后基因组时代,由于基因芯片(gene chip)、蛋白芯片(protein chip)的广泛应用,新的功能基因和蛋白的数量也必将随之而大量增加,而对其功能的进一步确定,又必须回到组织学的水平,与形态学结构联系起来,需要经过组织形态学的研究予以确认和支持,因而,组织学研究的工作量也就随之骤增。

然而,目前广泛应用于医学研究工作中的组织切片,常常由于在一个蜡块内只能包埋一种(个)组织样本,只能切出含有一份组织样本的切片,即单组织切片。因而,在进行大样本的科学研究中,必须制作大量的组织蜡块和组织切片,进行反复多次的相同实验操作,造成实验时间、人力和相关实验材料及试剂的大量浪费,既耗时、又耗力,也使同一研究中人为实验误差难以避免,使实验可比性降低。因此,寻求新的多组织包埋制片技术、简化实验次数、减少实验的工作量、提高实验效率十分必要。

为满足上述需要,实现多组织包埋,许多学者相继提出了不同的方法。1986年Battifora^[2]报道了一种多组织包埋技术(multitumor tissue block)——“香肠”技术(sausage)。它是将多块组织切成小条状,用羊膜包裹后,石蜡包埋、制片而成。该方法多用于免疫学检测,由于其组织定位差,组织样本容量有限,并不能同时将多个组织结构相似的待检组织样本包埋于同一蜡块,也不能对原有存档蜡块进行回顾性研究,而且蜡块制作繁琐,未能广泛应用。但却成为多组织包埋技术思想的萌芽。

1998年Kononen^[1]报道了一种组织微阵列技术,是将几十到几百个直径0.6 mm的小组织样本,以阵列方式包埋于同一块20 mm × 45 mm的石蜡蜡块中,然后进行切片,用于同一实验指标的研究。而由此蜡块切片可同时对数十个组织样本进行DNA、RNA或蛋白水平的原位组织学研究,使基因、蛋白水平的研究与组织形态学特征相结合。它只需一次实验过程即可完成普通实验所需的几十次相同实验操作,明显地提高病理组织学研究的效率,对于大样本的回顾性研究具有重大意义。这一技术日益受到重视得到广泛应用。有学者也将其称为组织芯片技术。

1999年本文作者也开始了这一技术的研究,设计了一种制作组织芯片的器具,已取得国家专利(专利号ZL 00207528.8)。该器械可适应不同实验的要求,针对不同标本数量、选择不同大小的组织样本,制作不同容量和大小组织芯片,以满足不同实验者实验需要。

2001年1月15日收到。

2 组织芯片的制作

2.1 设计策略

组织芯片采用了与基因芯片和蛋白芯片完全相反的设计策略。基因芯片和蛋白芯片是为检测一样本中的不同实验指标而设计的,而组织芯片技术是针对在原位检测不同样本中同一实验指标设计的,是将几十到几百个小组织样本以规则的阵列方式包埋于同一蜡块后,进行切片而制作成的,每张玻片上可同时排列几十到几百例小组织样本,可同时进行同一实验指标的研究。

2.2 制作方法

选择合适的已处理好的小块组织或利用显微镜对已有的单组织切片进行观察,选择合适区域,用专用挖取器挖取相应的石蜡蜡块中的相应区域内的组织,再依次以规则的阵列方式包埋入同一石蜡蜡块,按常规石蜡切片方法切片,即可制出组织芯片。

3 组织芯片的应用

3.1 在乳腺癌中的应用

1998年Kononen等人^[1]研究了1000例乳腺癌中P53和ER的表达。Barlund等人运用组织芯片技术和FISH(fluorescence in situ hybridization, FISH)技术,研究了372例乳腺癌中定位于17q23的6种基因。发现RAD51C、S6K、PAT1和TBX2均出现高度扩增和过度表达,S6K、PAT1和TBX2在10%的乳腺癌中同时被检出,而仅在3%的肿瘤中检出RAD51C^[3]。此外,Barlund还运用基因芯片技术检测了MCF-7系乳腺癌中4209条基因的表达中的过表达基因,然后用组织芯片技术和FISH技术研究668例乳腺癌中定位于17q23的另两条基因:核蛋白S6激酶基因(ribosomal protein S6 kinase, S6K)和HER-2基因的表达,结果显示S6K在59例(8.8%)中表达,而且表达水平与恶性程度正相关,S6K和HER-2基因同时表达的患者预后差^[4]。

3.2 在前列腺中的应用

Bubendorf等人应用FISH技术检测了371例前列腺组织样本(32例良性增生,223例原发癌,54例切除组织,62例转移癌组织)中AR、MYC、Cyclin-D1、ERBB2和NMYC等5种基因扩增水平,结果发现在早期前列腺癌中上述5种基因出现高水平扩增少见(<2%),而在激素不敏感者转移的癌组织中AR出现高水平扩增者为22%、MYC出现高水平扩增者为11%、Cyclin-D1出现高水平扩增者为5%,而

ERBB2、NMYC在进展期前列腺癌中未扩增出^[5]。此外,该小组还用基因芯片技术筛选出编码胰岛素样生长因子结合蛋白2(insulin-like growth factor-binding protein 2, IGFBP2)和热休克蛋白(27-kd heat-shock protein, HSP27)的基因。然后分析了26例前列腺增生、208例早期前列腺癌、30例激素不敏感的原位复发的前列腺癌和异种移植的激素不敏感型CWR22R前列腺癌及激素敏感型CWR22R前列腺癌中IGFBP2和HSP27的表达。结果发现IGFBP2在所有激素不敏感肿瘤和30%原发肿瘤中均有表达,而前列腺增生中未见表达^[6]。

3.3 在肾癌中的应用

Moch^[7]用基因芯片技术检测肾癌细胞系CRL-1933中5184种cDNA的表达,发现89种差异表达的基因中有一条基因是编码Vimentin的基因。然后用组织微阵列技术和免疫组化方法,检测532例肾癌组织中Vimentin的表达,结果发现51%透明细胞癌,61%乳头状癌出现阳性表达,而仅在4%的肾脏嫌色细胞癌和12%的嗜酸细胞癌中出现阳性表达,而且Vimentin的表达与患者预后密切相关,而与肿瘤的分歧、分级无关。这一结果与以前报道一致。因而认为,组织芯片技术和基因芯片技术结合将会在肿瘤生物学的研究中发挥巨大作用。

3.4 在膀胱癌中的应用

2000年Richter等人^[8]运用组织芯片技术,在2周内检测了1842例膀胱癌患者中2317份样本中cyclin E基因CCNE(编码周期素激酶2的调节亚基)表达。FISH技术发现只有1.9%(30/1561)表达CCNE,且和肿瘤的分歧、分级有关;免疫组化结果发现cyclin E在1873例肿瘤中233例(12.4%)强表达、354例(18.9%)弱表达、1286例阴性。在强阳性病例中表达强度从pTa期(22.2%)到pT1(45.5%)期明显增强,但在pT2-4期表达减弱,而且cyclin E低表达者预后差。cyclin E过表达型膀胱癌是膀胱癌的一种亚型,特别是膀胱癌早期浸润的一个特点。

3.5 在多肿瘤检测中的应用

运用组织芯片和FISH技术Schraml等人^[9]在1周内检测了17种肿瘤397例样本中CCND1, CMYC和ERBB23种癌基因的表达,发现CCND1在乳腺癌、肺癌、头颈部肿瘤和膀胱肿瘤中表达;ERBB2在膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、胃癌、睾丸癌和肺癌中表达;CMYC在乳腺癌、结肠癌、肾癌、肺癌、宫颈癌、膀胱癌、头颈部肿瘤和子宫内膜癌中表达。

4 组织芯片的优点

4.1 可提高实验效率

组织芯片技术可将几十甚至数百例组织样本同时包埋于同一蜡块,因此只需一次操作即可完成普通实验所需的几十次操作。Richter^[8]在2周内检测1 842例膀胱癌患者中2 317份样本中 cyclin E 基因 CCNE 的表达。Schraml^[9]在1周内用 FISH 技术检测了17种肿瘤397例组织样本中3种癌基因 CCND1, CMYC 和 ERBB2 的表达。因此,组织芯片技术对于提高实验效率,进行大样本的研究组织学原位研究具有重大意义。

4.2 有助于减少实验误差

由于组织芯片技术将几十甚至数百例组织样本同时设置于同一切片,因此,其实验条件将在最大程度上保持一致,减少因普通实验方法中分批、分次实验造成的因实验条件不同引起的实验误差。此外,由于小块组织样本是依据原始档案蜡块的石蜡切片而选择的,因此,可人为地控制组织样本中的细胞成份(实质与间质的比例),并且可避开出血、坏死、感染等有可能对结果造成不良影响区域,这也有助于实验结果的判定,减少假阴性、假阳性的发生,增加实验结果的真实性、可靠性、科学性。

4.3 便于设置实验对照

组织芯片技术制作蜡块时,可在蜡块的任意阵列位置设置可作为对照的组织(如:阳性对照组织,阴性对照组织,正常对照组织等),这样,有利于对实验结果的判定和实验操作质量的控制。

4.4 有利于原始存档蜡块的保存

由于组织芯片上的组织样本是依据原始档案蜡块的石蜡切片而选择的,是应用特制的挖取器挖取的,因此,仍然保存了原始档案蜡块的大部分组织结构,并不会因为多次切片而将原始蜡块消耗殆尽,而且还可对同一枚原始档案蜡块进行挖取多次。

5 存在的问题

5.1 组织样本的代表性问题

组织芯片上组织样本的大小能否代表原组织标本的情况?仍为实验者所关心。Kononen 等人^[1]制作0.6 mm直径的组织样本的组织芯片,每一组织微芯片中单一组织中可包含600—1 300个以上细胞,足可反映原组织结构的信息。为使挖取的组织块能更全面的代表原组织蜡块结构,并保持组织完整性,我们采用了直径1.5 mm组织样本,理论上可包含

4 000—20 000个细胞。

5.2 组织芯片技术的实用价值

尽管自1998年以来,相继有十余篇文献讨论组织芯片技术的实用价值,并且也已经证明这一技术在本位组织学研究中具有重大的应用价值,特别是其与基因芯片技术联合使用将会发挥更巨大的作用。但是,组织芯片技术能否在病理组织学实验中大面积推广,仍需大量实验验证。

5.3 组织芯片的制备问题

尽管 Kononen^[1]提到了组织芯片的制备方法,我们也就组织芯片的制备器具申请了专利,但是,作为一种新的技术,目前仍存在一些制备方面的问题,如:如何简化制备过程,提高自动化程度?如何减少脱片率,保证组织芯片的成品率。因此,仍需要对其制备方法做进一步的深入研究和探讨。

总之,组织芯片作为一种新的生物芯片,无论其设计策略还是制备分析方法均与基因芯片和蛋白芯片有着本质的不同。尽管组织芯片技术已经在组织学原位研究领域发挥了巨大作用,但是,仍需对其制备、应用及分析方法等方面进行更加深入的研究,使其在医学研究中发挥更大的作用。

参 考 文 献

- [1] Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A et al. Tissue microarrays for high throughput molecular profiling of tumor specimen. *Nat. med.*, 1998, 4: 844—847.
- [2] Battifora H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab. Invest.*, 1986, 55:244—248.
- [3] Barlund M, Monni O, Kononen J et al. Multiple genes at 17q23 undergo amplification and overexpression in breast cancer. *Cancer Res.*, 2000, 60(19):5 340—5 344.
- [4] Barlund M, Forozan F, Kononen J et al. Detecting activation of ribosomal protein S6 kinase by complementary DNA and tissue microarrays analysis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2000, 92(15):1 252—1 259.
- [5] Bubendorf L, Kononen J, Koivisto P et al. Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cancer Res.*, 1999, 59(4):803—806.
- [6] Bubendorf L, Kolmer M, Kononn J et al. Hormone therapy failure in human prostate cancer: analysis by complementary DNA and tissue microarrays. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1999, 91(20):1 758—1 764.
- [7] Moch H, Schraml P, Bubendorf L et al. High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. *Am. J. Pathol.*, 1999, 154(4): 981—986.
- [8] Richter J, Wagner U, Kononen J et al. High-throughput tissue microarray analysis of cyclin E gene amplification and overexpression in

urinary bladder cancer. *Am. J. Pathol.*, 2000, 157(3):787—794.
 [9] Schraml P, Kononen J, Bubendorf L et al. Tissue microarrays for gene

amplification surveys in many different tumor types. *Clin. Cancer Res.*, 1999, 5(8):1 966—1 975.

A NEW KIND OF BIOCHIP——TISSUE CHIP

Yang Jun Zhang Mingjuan

(Department of Pathology, The Second Hospital of Xi'an JiaoTong University, Xi'an 710004)

Abstract This paper mainly introduced the development of tissue chip, and explored its application and values in pathological research.

Key words tissue chip, tissue microarrays, biochip, pathological histology

·资料·信息·

国家自然科学基金委员会与 中国节能投资公司建立联合研究基金

为了加强科技源头创新和促进有效的产学研结合,增进我国的创新能力,国家自然科学基金委员会与中国节能投资公司决定建立联合研究基金,共同资助我国节能和环保领域有重要科学意义和应用价值的基础研究和应用基础研究项目,推动我国节能环保科学技术的发展,以鼓励创新、学科交叉和产学研相结合,优先支持青年科技人才。

协议签字仪式于2001年4月6日在人民大会堂举行。全国人大教科文卫委员会副主任朱丽兰、国家自然科学基金委员会主任陈佳洱和中国节能投资公司总裁怀力田出席了签字仪式并发表了热情洋溢的讲话,国家自然科学基金委员会副主任朱道本和中国节能投资公司副总经理刘顺兴分别代表双方在协议上签字。

本项联合研究基金将按照科学基金制的评审原则和管理模式进行管理,面向全国,自由申请,专家评审,择优支持。第一期联合研究基金为期3年,双方每年各出资500万元,3年共计3 000万元,作为第一期联合研究基金,双方合作将更好地实现优势互补,这对促进该领域应用基础研究与国家目标结合,加速研究成果转化等具有重要意义。

中国节能投资公司是中央企业工委直接管理的国有独资企业,是国家在节能、环保领域唯一的投资公司,是集投资、实业、咨询、进出口贸易于一体的大型企业集团。公司方向主要是执行国家产业政策和以节约能源为主的资源节约、环境保护政策,采用投、融资方式开发节能、节材、环保和高科技项目,建

设节能环保产业,促进合理利用资源和环境的有效保护,实施可持续发展战略。

陈佳洱主任在签字仪式上说,国家自然科学基金委员会作为国家创新体系的一个重要组成部分,非常重视推动知识创新和技术创新的衔接,在从源头创新到技术创新过程中,充分发挥桥梁和纽带作用,积极推动基础研究的社会化,促进国家创新体系建设。同时积极拓宽渠道,鼓励和加强与政府、企业的合作,开展对基础研究和应用基础研究的联合资助。不断探索联合资助的新模式,进一步加强基础研究对社会和国民经济建设的贡献,有效促进“科技源头创新”和“知识创新与技术创新并举”。他介绍说,在此之前,国家自然科学基金委员会已经与中国工程物理研究院、上海宝钢集团公司、微软中国研究院、贝尔中国研究院、摩托罗拉公司等建立了联合资助基金。他表示相信,这一联合基金的建立一定能为我国节能环保产业的进一步发展,促进社会进步和经济的增长作出贡献。

怀力田总裁相信,通过双方的优势互补,一定会实现以知识创新促进技术创新的目的。朱丽兰副主任说,联合基金的设立,不仅仅是钱的问题,而是表明了双方的战略眼光,代表了科技发展的方向,具有很大的意义,她希望该项联合基金的使用方式也要创新,作到“软技术”和“硬技术”的结合,为我国的节能和环保事业,为实现“可持续发展”和“科教兴国”战略的实施作出贡献。

(科学基金杂志部 汤锡芳 供稿)