

荧光原位杂交技术及其在肿瘤生物学中的应用

黄贻学^① 方 燕 郭 颖

(中山医科大学肿瘤研究所; 广州, 510060)

摘 要 荧光原位杂交(FISH)是近年应用起来的一种新的分子细胞遗传学技术。该方法具有简便、快速、安全、稳定及结果直观等优点,目前被广泛用于细胞遗传学、产前诊断、核组成、基因定位、基因扩增和缺失的检测,以及肿瘤生物学等领域。本文主要综述了 FISH 技术的发展史、方法机理及其在肿瘤基础研究和临床研究中的应用。

主题词 原位杂交; 荧光; 肿瘤标记; 生物学

中图分类号 Q331; R73-3

荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, 简称 FISH)是一种应用非放射性荧光物质依靠核酸探针杂交原理在核中或染色体上显示 DNA 序列位置的方法。该项技术自 20 世纪 70 年代后期间世以来,已逐渐用于细胞遗传学、产前诊断、核组成、基因定位、基因扩增和缺失的检测及肿瘤生物学等领域。尤其是近几年, FISH 技术发展日新月异,出现多色 FISH、Micro-FISH 及 Fibro-FISH、比较基因组杂交、Microarray 及 Tissue array 等新技术,使 FISH 应用更广泛。该技术之所以应用如此广泛,因为其具有下列优点:①探针稳定、操作安全、快速、特异性高;②多色 FISH 可以在同一核中显示不同的颜色,从而同时检测两种或多种序列。目前已有用 5 种荧光素显示 23 种颜色来代表 23 对染色体,从而使核型分析直观简单^[1];③FISH 不仅可用于中期染色体,也可用于间期细胞,甚至可以显示核内 DNA 的三维结构^[2];④反向染色体涂染可以准确辨别新生染色体的来源,使细胞遗传学的研究更准确、客观^[3];⑤Microarray^[4]和 Tissue array^[5]的出现,使得一次性检测几百个基因或几百个组织成为可能,加速了对检测的速度,应用前景很广泛。

人类肿瘤是由于细胞中遗传物质的改变所致,遗传物质的改变在细胞遗传学中主要表现为染色体数目或结构的异常、异常染色体的出现等,在分子水平上表现为 DNA 片段的扩增、缺失等。FISH 应用于肿瘤生物学将为肿瘤的病因及预防、诊断开拓广阔前景。

本文就 FISH 技术的发展史、方法及其在肿瘤生物学研究中的应用作一简要综述。

1 FISH 技术的发展史

60 年代末, Pardue 等就在中期染色体标本上建立了放射性原位杂交法。70 年代后期,非放射性标记法也接着问世。直到 1981 年, Rouman 首次报道了荧光素标记的 cDNA 作原位杂交。同年, Langer 等用生物素标记核苷酸制备探针。两年后,有人成功地用该探针在组织切片上检测病毒 DNA,为非放射性标记法应用于临床奠定了基础。1987 年,染色体原位抑制杂交(CISS)法的创建,使 FISH 技术得以迅速发展。Cherif 等对该技术做了一些改进,用随机引物法来标记探针 DNA,在亲和素化荧光素的基础上再加相应的生物素化抗亲和素抗体,通过增加亲和素的检测复合物的层数,使荧光信号不断扩大,从而明显提高了检测灵敏度。Cremer 等用生物素和汞或氨基乙酰荧光素(AAF)标记探针建立了双色 FISH 技术。1990 年 Nederlof 等提出用 3 种荧光素探测 3 种以上的靶位 DNA 序列,创建了多色 FISH 方法。Speicher 和 Ried 等用不同的荧光染料组合标记不同的染色体,经过计算机图像分析系统,同时显示了人类所有 24 条染色体的 FISH 图像^[1]。Guan 等运用染色体切割技术制备了人类染色体 24 个长臂及 19 个短臂的染色体臂涂染探针(chromosome arm painting probe, CAP)弥补了整条染色体涂染探针不能分辨同一染色体臂间易位及染色体倒位的缺点^[2]。同时,通过染色体切割,创建 Micro-FISH 或反向染色体涂染(reverse chromosome painting)。新近研究的染色体定向荧光原位杂交

^① 97 届硕士生

(chromosome orientation and direction fluorescence in situ hybridization, COD-FISH)使 FISH 探针只能与中期染色体的一个单体沿着短臂→长臂的方向杂交。倒位时染色体方向改变, 杂交信号异常, 与倒位区外的参照探针相比, 即可明确倒位的存在^[3]。CGH 的出现可以在一次实验中对整个基因组的变化进行检测。目前已经应用于几十种肿瘤, 为肿瘤病因的研究提供了理论依据。随着 FISH 技术本身的发展, Fibro-FISH 和 Tissue array microarray 已在人类分子细胞遗传学研究中发挥作用, 尤其在肿瘤生物学研究中的应用越来越引人注目。

2 FISH 的主要操作步骤

2.1 探针的制备

FISH 常用的探针有: ①整条染色体探针, 又称染色体涂染探针, 用于检测分裂细胞中的染色体结构畸变和标记染色体; ②着丝粒特异性探针, 用于检测间期和中期细胞中的非整倍体; ③位点特异性探针, 用于检测同源性染色体易位和基因异常。新近制备的探针有: ①染色体臂涂染探针, 用于分辨同一染色体臂间易位及染色体倒位; ②端粒探针, 检测实体瘤细胞常见的染色体臂末端微小缺失及易位; ③染色体带纹探针, 检测染色体某一特定区带的扩增或缺失。

探针标记分为直接标记和间接标记。直接标记就是将荧光素直接与探针相连。间接标记法是先从探针上接一半抗原, 再用能同半抗原特异结合的带荧光标记的蛋白对其进行检测。

标记方法多用缺口平移、随机引物标记和 PCR 扩增法。

2.2 玻片标本制作及处理

用常规方法制备染色体玻片, 放置 3~10 日或放入 60℃ 烤 3 h。为降低本底, 杂交前可用 RNA 酶和蛋白酶 K 消化处理标本, 然后再将玻片在 70% 甲酰胺中热处理一定时间, 使 DNA 变性, 然后于冷无水乙醇中退火, 风干备用。

2.3 杂交

把变性后的探针加到处理后的玻片上, 37℃ 杂交 16~20 h, 杂交完成后必须将游离的探针充分洗去。凉干后加适量的抗褪色液。

2.4 检测和显色

检测方法包括直接荧光法和间接免疫荧光法。

如用荧光染料直接标记探针, 可直接置于荧光显微镜下观察; 若探针是用一个半抗原标记的, 则可通过间接免疫荧光法进行检测。用生物素标记的探针经常用 FITC (绿荧光)、德克萨斯红或罗丹明 (红荧光) 标记的亲合素来显色观察, 也可通过生物素化抗亲和素抗体夹层逐级放大信号进行检测, 玻片还常用碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 补染, 以便在荧光显微镜下观察杂交信号的同时, 能看到胞核及染色体结构。

3 FISH 在肿瘤生物学中的应用

3.1 在肿瘤基础研究中的作用

3.1.1 检测染色体数目异常 研究资料显示, 各类型的血液系肿瘤具有特异的染色体改变, 这些异常与疾病的预后及治疗效果有关。白血病患者大多数有染色体数目改变。有报道 80% 以上的 AML 有非整倍体, 特别是亚二倍体。急性淋巴细胞白血病 (ALL) 多为超二倍体; 慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 常见 12 号三体; 骨髓增生异常综合征 (MDS) 则为 5 号单体、7 号单体及 8 号三体等。应用 FISH 能快速准确地显示染色体数目异常, 克服了传统的细胞遗传学上由于染色体形态欠佳而难以观察的缺点。1991 年 Kreker 等曾应用 FISH 在 3 种病人检查了常规方法不易发现的低百分率 8 号三体性细胞, 含 12 号染色体三体的 CLL 病人预后佳。由于 CLL 细胞分裂指数低, 常规细胞遗传学方法也难于检测这样的变化。Anastassi^[9] 应用 FISH 在间期细胞检测 12 号三体的方法, 使检测简单灵敏。

3.1.2 染色体结构异常的确定 肿瘤的发生、发展, 与染色体的数量、结构异常密切相关。利用染色体特异探针序列有助于识别染色体来源及分析复杂核型。①染色体易位: Speicher 等^[7] 用 CISS 和常规细胞遗传学方法对 4 例临床上拟诊为早幼粒细胞白血病 (APL) 患者做了 t(15; 17) 检测的比较研究, 用来源于人类 17 号和 15 号染色体的 DNA 文库为探针, CISS 证实了 3 例有 t(15; 17), 1 例不能识别是否有 t(15; 17), 1 例因分裂相少、染色体形态差而无法分析。可见 CISS 是一种能迅速而明确地识别或除外 t(15; 17) 的主要手段。白血病、淋巴瘤以及日渐增多的肉瘤都具有特异染色体的易位。结果

导致原癌基因的激活或新的癌基因嵌合体形成。FISH 能在整个核型分析中辨明染色体易位, 并利用混合多色探针可检测特定染色体易位。新近发现几种肉瘤有标志性的易位: 粘液性脂肪肉瘤 t(12; 16)(q13; p11)、横纹肌肉瘤 t(2; 13)(q37; q14)或 t(1; 3)(p13; q14)、平滑肌瘤 t(12; 14)(q14-15; q23-24)、疣状化肉瘤 t(11; 22)(q24; q12)、滑膜肉瘤 t(X; 18)(p11; q11)等, 这些易位均可用 FISH 特定的探针检测。②染色体缺失与扩增: 一般来说, 实体肿瘤染色体改变比血液系统肿瘤复杂。染色体的缺失在肿瘤很常见, 抑癌基因的失活常见与等位基因突变和其它等位基因的染色体区缺失有关。FISH 可用单个或多个染色体探针、YAC 或 Cosmid 探针测定大或小的缺失。例如, 乳腺癌的杂合性缺失发生在 3p 上的 3 个位点, 用着丝粒探针和特定位点探针测定^[8]。用 3 号染色体着丝粒探针和几个特定位点 Cosmid 或 YAC 探针检测 Kaposi 肉瘤里 3p14-ter 区位点丢失^[9]。染色体扩增形式有双微体(DMs)和均匀染色区(HSR)。肿瘤的发生发展及转移早期均与扩增有关。例如: erbB-2 过度表达或扩增在许多肿瘤中提供肿瘤复发与预后标准^[10], 新近研究 84 例乳腺癌, myc、erb-2、H-ras 基因扩增^[11] 均可用 FISH 进行特异性检测。

3.1.3 基因定位 基因的染色体定位是目前 FISH 在分子细胞生物学上应用的主要方面。在肿瘤研究中, 可用 FISH 定位分离出癌基因和抗癌基因。例如 3、6、11 号染色体上的遗传物质的改变在肿瘤中常见。Yamakawa 等用 FISH 在 3 号定位了 75 个标记序列。Saitodg 等则分离并定位了 64 个 6 号染色体 RFLP 片段。对分离 6 号染色体上可能存在肿瘤抑制基因具有很大作用。Hori 和 Tokino 等^[12] 分别用 FISH 进行了 11 号染色体标记 DNA 细胞遗传学定位, 其中许多定位点与肿瘤染色体重排断裂点、肿瘤抑制基因有关, 为进一步研究这些部位基因分子特征提供了方便。

3.1.4 病毒基因插入基因组部位的检测 研究资料显示, 某些病毒感染可能与某种肿瘤发生相关, 例如: 鼻咽癌与 EBV 感染有关、子宫颈癌与 HPV 感染有关、原发性肝癌与 HBV 感染有关, 通过 FISH 可检测这些病毒整合到宿主 DNA 基因的位点。如 HPV-18 单拷贝定位在 8q22 染色体的脆性部位, 此

部位也是几种恶性肿瘤的重组区^[13]。Lawrence 等用 FISH 方法发现了核内相隔 130 kb 的两个 EBV 插入顺序。Hori 等用 FISH 发现 HPV-16 DNA 序列在一嗜银小细胞宫颈癌细胞系插入到 8q24.1 附近, 并扩增成一个类似均匀染色区的异常带。8q24 是个脆性部位, 和 C-myc 癌基因部位相一致, 这为深入了解 HPV 与宫颈癌癌变原因的关系奠定了基础。

3.1.5 比较基因组杂交 CGH 是一项建立在 FISH 基础上的分子细胞遗传学技术, 该技术可以在一次实验中检测出基因组变化的全貌。自从 1992 年^[14] 该技术建立以来, 已经对几十种肿瘤进行了检测, 发现了许多用以往的技术未检测出的增加和扩增的区域, 例如在肝癌中检测出 1q 的增加和 16q 的缺失, 在鼻咽癌中检测出 1q、12q 的增加和 16q 的缺失^[15], 在胃癌中检测出 22q 的缺失。

3.1.6 Microarray 和 Tissue array 应用 FISH 技术, 使 Microarray 可以在一次实验中检测出数百个基因在一个细胞中的表达情况(包括降低和增高)^[16]。而 Tissue array^[17] 则在一次实验中能检测出一个基因在数百个细胞中的表达情况, 这两种方法都是近两年才发展起来的新技术, 它可以大大地提高了实验进程, 具有广阔的应用前景。

3.2 肿瘤的临床应用

目前 FISH 术已慢慢应用在临床肿瘤的诊断、监测治疗效果、估计预后、探测早期复发等方面, 但仍以血液系统肿瘤为主, 其它实体肿瘤的临床应用则刚刚开始, 但 FISH 的应用仍有较大的前景。

3.2.1 检测微小残留病灶 除用特异的染色体探针检测分析各类血液系肿瘤外, 也可检测微小残留病灶(MRD)预测白血病复发白血病患者, 患者经化疗达到缓解后体内残留一定数目的白血病细胞, MRD 是导致复发的根源。有报道 1 例 ALL 患者, 初治时常规细胞遗传学方法显示大部分细胞为 21 三体, 小部分细胞核型正常, 强化治疗约 4 年后, 临床缓解, 常规细胞遗传学方法分析为正常核型与完全缓解(CR)相同, 但 FISH 结果揭示患者体内存在 MRD。Essudier 等用 12 号染色体特异性探针检测 6 例 CR 和 4 例 PRCLL 患者, 结果均发现有 12 三体, 随访时 1 例 CR 者已复发。Zhao 等^[18] 用 22 号染色体涂染探针, 检测 10 例经 α -干扰素治疗缓解 6~35

个月的 CML 患者, 其中 6 例 3%~9% 的细胞显示 ph+, 而常规细胞遗传学方法分析 20~25 个中期相, 9 例均 ph-。提示干扰素虽可抑制白血病细胞的增殖, 但不能消除恶性克隆。上述例子说明, FISH 结果为临床医生观察疗效提供了重要信息。

3.2.2 鉴别标记染色体(Mar)的起源 在肿瘤细胞多次出现的特异性染色体称为标记染色体 Mar, 常规细胞遗传学方法常难以鉴别 Mar 的来源, 而应用 FISH 对于识别各种未确定的 Mar 是一种可靠的方法。Cabelle 等用 FISH 法检测 1 例 CML 急性变期患者, 证实 Mar 为 +21 及 ph 染色体。Taniwaki 等^[19]用染色体特异 DNA 文库探针和特异位点 DNA 探针, 双色 FISH 技术成功地分析 1 例急性非淋巴细胞白血病 (ANLL) M56 患者两个 Mar 之来源, 一个为 der(1)t(1;2)(p11;?), 另一个为 der(21)t(16;21)(p11;q22), 而常规方法仅显示 46, XX, -16, +1p-, +21q+。Chen 等^[20]分别用 7 号和 9 号染色体特异性探针对 2 例急性粒细胞白血病, 1 例 CML 急性变期患者的 Mar 进行检测。1 例 AML 的 Mar 证实来自 7 号, 另一例并非来自 7 号, CML 的 Mar 为 der(9)。

3.2.3 确认骨髓瘤细胞的起源 用常规方法研究性别错配骨髓移植后造血细胞的克隆起源, 因分裂相数目太少, 常不能获得满意结果。借助 FISH 应用 X 染色体着丝粒和 Yq 探针, 可大量筛选间期细胞, 以鉴别性别错配骨髓移植 (BMT) 后的供者和受者细胞。Van Declen 用 Y 染色体特异性探针对 4 例男性和女性 (BMT 后或癌病复发) 患者进行了 FISH 检测并做了形态学检查。5 例患者形态学与 FISH 检测结果一致。2 例患者 FISH 显示体内有少量的男性宿主细胞, 但形态学显示为 CR。5 例患者做了常规方法分析, 3 例患者常规方法和 FISH 结果符合, 2 例患者常规方法分析为正常核型, FISH 则显示骨髓细胞分别出现 0.2% 和 7% 的男性宿主细胞。

3.2.4 其他 用与某种肿瘤密切相关的癌基因, 如 DNA 片段为探针, 检测相关肿瘤基因的扩增与缺失, 为研究肿瘤的发生发展和发病机理提供资料。与常规的细胞遗传学相比, 原位杂交更快速、更敏感、更准确, 而且具有统计学意义, 有助于提供基因异常的信息。

4 展 望

FISH 技术利用分子探针和光学显微镜在细胞分子水平研究细胞遗传物质的变化, 被认为是连接分子与细胞的桥梁技术。在肿瘤基础研究和肿瘤临床研究中, 可用于分析肿瘤细胞中复杂染色体异常的组成, 癌基因和抑癌基因的定位, 对肿瘤的诊断和预后具有重要的应用价值。随着 FISH 技术本身的发展、显微镜的改进、彩色技术的发展、计算机系统的完善, FISH 技术的灵敏度和分辨率将不断提高。可以预言, 在不久将来, FISH 技术将成为肿瘤研究中的常用工具, 若与其它细胞遗传学方法结合使用, 如 CGH (比较基因组杂交) 技术和免疫表型等, 更加显示其生机活力。FISH 技术的出现, 将使肿瘤的生物学研究跨入一个辉煌阶段。

参 考 文 献

- 1 Speicher M R, Gwyn Ballard S, Ward D C. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat Genet*, 1996, 12(4): 368
- 2 Guan X Y, Zhang H, Bittner M, *et al*. Chromosome arm painting probes. *Nat Genet*, 1996, 12(1): 10
- 3 Bailey S M, Meyne J, Comforth M N, *et al*. A new method for detecting pericentric inversions using COD-FISH. *Cytogenet Cell Genet*, 1996, 75(4): 248
- 4 Khan J, Bittner M L, Chen Y, *et al*. DNA microarray technology: the anticipated impact on the study of human disease. *Biochem Biophys Acta*, 1999, 1423(2): M17
- 5 Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, *et al*. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Medicine*, 1998, 4(7): 844
- 6 Anastasi J, Le Beau M M, Vardiman J W, *et al*. Detection of trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia by fluorescence in situ hybridization to interphase cells: a simple and sensitive method. *Blood*, 1992, 79(7): 1796
- 7 Speicher M R, Jauch A, Parr A, *et al*. Delineation of translocation t(15;17) in acute promyelocytic leukemia by chromosomal in situ suppression hybridization. *Leuk Res*, 1993, 17(4): 359
- 8 Chen L C, Matsumura K, Deng G, *et al*. Deletion of two separate regions on chromosome 3p in breast cancers. *Cancer*

- Res, 1994, 54(11): 3021
- 9 Popescu N C, Zimonjic D B, Levintov-kriess S, *et al*. Deletion and translocation involving chromosome 3(p14) in two tumorigenic kaposi sarcoma cell lines. *J Natl Cancer Inst*, 1996, 88(7): 450
 - 10 Kraus M H, Popescu N C, Amshaugh S C, *et al*. Over-expression of the EGF receptor-related proto-oncogene erbB-2 in human mammary tumor cell line by different molecular mechanisms. *EMBO*, 1987, 6(3): 605
 - 11 Janocko L E, Lucke J F, Groft D W, *et al*. Assessing sequential oncogene amplification in human breast cancer. *Cytometry*, 1995, 21(1): 18
 - 12 Hori T, Takahashi E, Tanigami A, *et al*. A high-resolution cytogenetic map of 168 cosmid DNA markers for human chromosome 11. *Genomics*, 1992, 13(1): 129
 - 13 Gallego M I, Zimonjic D, Popescu N C, *et al*. Integration site of human papillomavirus type-18 DNA in chromosome 6 and 8q22.1 of C4-1 cervical carcinoma; DNase I hypersensitivity and methylation of cellular flank sequences. *Gene Chromosome Cancer*, 1994, 9(1): 29
 - 14 Kallioniemi A, Kallioniemi O P, Sudar D, *et al*. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumor. *Science*, 1992, 258(5083): 818
 - 15 郭颖, 方 嫵, 梁启万, 等. 47 例鼻咽癌遗传变异的研究. *癌症*, 1999, 18(1): 5
 - 16 Bubendorf L, Kononen J, Koivisto P, *et al*. Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughput fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. *Cancer Res*, 1999, 59(4): 803
 - 17 Khan J, Saal L H, Bittner M L, *et al*. Expression profiling in cancer using cDNA microarrays. *Electrophoresis*, 1999, 20(2): 223
 - 18 Zhao L, Kantarjian H M, Van Oort J, *et al*. Detection of residual proliferating leukemic cells by fluorescence in situ hybridization in CML patients in complete remission after interferon treatment. *Leukemia*, 1993, 7(2): 168
 - 19 Taniwaki M, Speicher M R, Lengauer C, *et al*. Characterization of two marker chromosomes in a patient with acute non-lymphocytic leukemia by two-color fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*, 1993, 70(2): 99
 - 20 Chen Z, Morgan R, Berger C S, *et al*. Application of fluorescence in situ hybridization in hematological disorders. *Cancer Genet Cytogenet*, 1992, 63(1): 62

(1999-06-16 收稿 1999-08-23 修回)

(上接第 91 页)

- 12 Bishop G A, Sun J, Sheil A G, *et al*. High-dose/ activation-associated-tolerance, a mechanism for allograft tolerance. *Transplantation*, 1997, 64(10): 1377
- 13 Von Boehmer H. Immunology: tolerance by exhaustion. *Nature*, 1993, 362(6422): 696
- 14 Sun J, Bishop G, Wang C, *et al*. Quantity of donor tissue and rat allograft survival. *Transplant Proc*, 1997, 29(1-2): 1143

(1999-06-17 收稿)