

荧光原位杂交技术及其在医学诊断上的应用*

陈琦 贾宇臣 王利 郑源强

(内蒙古医学院分子生物学研究中心 内蒙古 呼和浩特 010059)

摘要 荧光原位杂交技术是近年来生物学领域发展起来的将经典的细胞遗传学与分子遗传学结合起来一项新技术。该技术具有广泛的应用潜力,在细胞生物学、分子生物学、医学等众多领域快速发展。本文介绍了荧光原位杂交技术的基本原理和操作方法,并对该技术目前的发展状况以在医学诊断上的应用进行了阐述。

关键词 荧光原位杂交(FISH) 癌症 产前诊断 医学诊断

中图分类号:Q343,Q75 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)05-988-04

Fluorescence in Situ Hybridization and it's Medical Application*

CHEN Qi, JIA Yu-chen, WANG Li, ZHENG Yuan-qiang

(Research Center of Molecular Biology, Inner Mongolia Medical College Hohhot 010059, China)

ABSTRACT: Fluorescence in situ hybridization (FISH) is a new technique developed in the field of biology in recent years. FISH is a powerful technique that covers a gap between classical cytogenetic and molecular-genetic techniques. By the broad spectrum of application possibilities it leads to important new developments in cytogenetics, medical diagnostics, molecular biology and so on. This review give a brief overview of the principle, operational approach, developments of FISH and it's medical applications.

Key words: Fluorescence in situ hybridization; FISH; Cancer; Prenatal diagnosis; Medical diagnostics

Chinese Library Classification(CLC): Q343,Q75 Document code: A

Article ID:1673-6273(2012)05-988-04

虽然早在20世纪60年代末70年代初原位杂交技术就已经诞生,但是当时采用的是放射性的DNA探针,存在人身安全及探针处理等问题。直至原位杂交技术开始使用荧光标记DNA探针,这才开启了荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)的时代。荧光原位杂交技术是一种应用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。与传统的放射性标记原位杂交相比,FISH具有安全、快速、经济、灵敏度高、检测信号强、杂交特异性高、能同时显示多种颜色等优点,因此自该技术问世以来,发展迅速,并广泛应用于分子生物学、医学、细胞遗传学等许多领域。

1 FISH技术的原理及操作步骤

FISH的基本原理是用已知的标记单链核酸作探针,按照碱基互补的原则,与待检材料中未知的单链核酸进行异性结合,形成可被检测的杂交双链核酸。由于DNA分子在染色体上是沿着染色体纵轴呈线性排列,因而可以探针直接与染色体进行杂交从而将特定的基因定位在染色体上,可以对待测核酸定性、定位或相对定量分析。

FISH的基本操作步骤包括染色体制备、探针标记、将探针与实验材料靶序列杂交以及检测杂交结果。

(1)染色体制备。原位杂交的效率取决于探针与染色体的靠近程度,因此获得背景清晰、染色体分散、形态较好的中期分裂相是FISH中很关键的一步。

(2)探针的制备。常用的探针包括三类,第一类是染色体特

异重复序列探针,包括 α 卫星和卫星类探针等,杂交靶位常大于1Mbp,不含散在重复序列、与靶位结合紧密、杂交信号强、易于检测,常用于检测间期细胞非整倍体和微小标志染色体;第二类是全染色体或染色体区域特异性探针,这类探针由一条染色体或染色体上某一区域几个不同核酸片段组成,可由克隆到噬菌体和质粒上的染色体特异性大片段通过构建文库制备,由于所得探针片段较小,故杂交时与邻近区域发生重叠及制片过程中被破坏的可能性较小,常用于中期染色体重组和间期核结构分析;第三类是位点特异性探针,这类探针由一个或几个克隆序列组成,可由cDNA克隆或克隆到大片段插入载体的核酸片段制备。主要用于染色体DNA克隆序列的定位和靶DNA序列拷贝数及结构变化的检测^[1,2]。

探针用特定分子标记,酶解为200-400bp,这样能增强特异性杂交,同时又减少本底荧光。探针的荧光素标记分为直接标记法和间接标记法。直接标记法是用荧光染料直接标记核苷酸,常用荧光染料有异硫氰酸荧光素及罗丹明等。间接标记法是在DNA探针上连接一种半抗原,然后通过能与半抗原特异结合的标记蛋白对目标核酸分子进行检测。最常用半抗原生物素和地高辛酸基等。探针的标记方法采用缺口平移法、PCR扩增法、随机引物标记法、RNA体外转录法等。探针标记通常有两个目的:一方面将标记好的核苷酸加入到探针序列中去,另一方面可以将DNA片段长度缩小到500bp以下。

(3)原位分子杂交。最佳杂交条件取决于探针和目标的性质。在含有甲酰胺(DNA变性剂)、硫酸葡聚糖(一种高分子惰

* 基金项目:内蒙古医学院博士启动金(ny bq2010cq)

作者简介:陈琦(1980-)女,博士,副研究员,研究方向:肿瘤免疫学,E-mail: yongqi-1@163.com,电话:15848925707

(收稿日期:2011-08-02 接受日期:2011-08-23)

性聚合物)和盐的杂交液中混合标记的探针(200~500 bp)。变性后,将探针混合液置于玻片上,如果检测染色体特异重复序列,37℃温育15min,而对于单序列大的插入探针,探针混合物先和未标记的基因组或者Cot I重复序列预杂交1h(探针中非特异的重复序列被封闭,抑制重复序列结合靶DNA),然后与探针37℃杂交过夜。

表1 常用于标记的荧光分子及其性质

Table 1 The fluorescent molecules commonly used in the table and it's properties

荧光分子 Fluorescent molecules	最大激发光(nm) Maximum exciting light/nm	最大发射光(nm) Maximum emitted light/nm	荧光 Fluorescent
Cy-5	650	670	Invisible infrared light
AMCA	358	450	Blue
罗丹明(Rhodamine)	550	575	Red
德州红(Texas Red)	595	615	Dark red
异硫氰荧光素(FITC)	495	515	Green

(5)检测分析。将杂交好的片子置于荧光显微镜下,选择合适的滤光片观察并照相,也可用共焦激光扫描记入计算机。荧光镜检时显微镜的质量及滤片的选择,是获得满意结果的重要因素,尤其是滤片系统,应严格按照表1所列的荧光激发/发射光波长,选择最适的激发/阻挡滤片组合。

2 FISH 技术的发展

原位杂交技术是Gall和Pardue(1969)分别发现的,利用放射性同位素标记的DNA探针检测细胞制片上非洲爪蟾细胞核内的rDNA^[3,4],当时是使用放射性同位素标记核酸用于原位杂交。随着分子克隆、同位素标记和核酸的化学合成技术的发展,在上世纪八十年代逐渐用非放射性半抗原如生物素进行核酸标记,虽然摒弃了放射性同位素,但方法繁琐、敏感度低、背景高^[5]。1986年FISH技术问世,该法具有敏感度高、信号强、背景低、快速等优点^[6,7],因此得到的迅速发展,在方法上逐步形成了从单一荧光向多色荧光,从中期染色体FISH向粗线期染色体FISH再向fiber-FISH的发展趋势,灵敏度和分辨率也有了大幅度的提高。FISH的应用范围也进一步扩大,这项技术已经广泛应用于动植物基因组结构研究、染色体精细结构变异分析、病毒感染分析、人类产前诊断、肿瘤遗传学和基因组进化研究等许多领域。

FISH经过不断的发展,在此基础上形成了多色荧光原位杂交技术、DNA纤维荧光原位杂交技术、ring-FISH等一系列新技术。

(1)多色荧光原位杂交(M-FISH)。有Multicolor、Multiplex、Multitarget3种类型,它最大的特点就是在一次FISH试验中可完成多次繁琐的FISH实验和多种不同基因的定位。Cremer(1988)等用生物素和汞或氨基乙酰荧光素(AFA)标记探针建立了双色FISH技术^[8]。Nederlof等(1990)提出多色FISH方法,用三种荧光素探测多个靶位DNA序列。应用多色FISH结合光谱核型分析方法可以进行全面的FISH筛选,分析染色体的全部组分从而确定未知的异常。此法一次能进行多个基因的片段的鉴定,快速、简单,而且可以检测中期和间期相内的染色体

(4)荧光标记。错配或未杂交的探针经过洗脱后,把玻片与免疫荧光试剂共同温育,在探针杂交的位置形成荧光。常用的荧光标记物为荧光素异硫氰酸盐(FITC)、罗丹明、德克萨斯(Texas)红等,其它光谱从蓝色到红色的荧光物质都可用于多种颜色分析。检测常用于标记的荧光分子及其特征如表1。

畸变。

(2)DNA纤维荧光原位杂交技术(DNA fiber-FISH)。最初的纤维-FISH是Weigant等和Heng等发现的,利用化学方法将染色体进行线性化,再以此线性化的染色体DNA作为载体进行FISH,显著提高了FISH的分辨率。Parra和Windle(1993)、Heiskanen等(1994)、Florijn等(1995),进一步改进了伸展DNA纤维的方法,使DNA纤维的伸展程度由起初的80 kb/ μ m到现在的2.5~3.5 kb/ μ m,这一数值非常接近Watson-Crick建立的DNA双螺旋模型中B-DNA分子的理论值2.79 kb/ μ m,因此说现在得到的DNA纤维基本上是裸露的双螺旋分子。纤维-FISH具有对模板要求不高、分辨率和灵敏度高、可定量分析、只需分析少量的DNA分子(<10个)等优点。

(3)ring-FISH。利用多聚核苷酸探针,首次允许检测质粒上的单个基因、单个细胞及基因片段中的核酸,此法的杂交信号特征是在细胞周边包含一个像光晕、圆圈形状的荧光聚集。

除此之外还有很多方法,例如subtelomeric-FISH在检测端粒方面显示出不可比拟的优越性。re-FISH可以对同一种样本进行复杂DNA探针进行4次之多的再杂交,为通过过滤荧光显微术的传统条带提供了新的应用前景。高分辨率FISH可以使分辨率达到几个碱基,使基因绘图更加精确,也使疾病的诊断更加准确。

3 FISH 技术在医学诊断上的应用

3.1 FISH 在癌症诊断上的应用

大多数实质固态瘤,包括泌尿上皮细胞癌,都具有染色体数目和结构异常的特征。在癌症研究中,FISH可用于对分离出的癌基因和抗癌基因的定位,这对研究肿瘤中常见的染色体或基因改变,进一步研究其生物学和分子特征提供了依据。

梁芳等(2008)对PP2Ac突变型肺癌相关基因在染色体区域进行定位,荧光显微镜下观察分析杂交信号的特征。结果发现正常人淋巴细胞的染色体5q23-31可见明显杂交信号,在GLC-82细胞的5号和7号染色体上出现较强信号,说明点突变引起PP2Ac活性改变,从而基因易位,导致肺肿瘤的产生^[9]。

泌尿上皮细胞癌的癌细胞容易剥落至尿中, FISH 可以检测尿中的细胞是否发生染色体异常, 辅助诊断泌尿上皮细胞癌。Cajulis 等研究发现利用 FISH 检测膀胱脱落细胞的染色体异常有助于诊断膀胱癌^[10]。大肠癌新相关基因 HSU17714 的染色体定位研究时, 采用强化荧光原位杂交技术, 以生物素化酪胺强化荧光原位杂交信号。结果 80.0%(128/160) 的间期细胞和 59.8%(104/174) 的中期分裂相可见到明显集中的 HSU17714 基因的杂交信号, 相应荧光 R 带分析中, 85.1%(40/47) 在 22 号染色体上 1 区 3 带处有杂交信号^[11]。FISH 技术在检测脂肪细胞肿瘤中的染色体易位及重排时, 具有更高的敏感性和准确性。最近很多分子细胞遗传学研究表明确易位 t(11;16)(q13;p13) 导致软脂脂肪瘤中出现 C11orf95-MKL2 融合基因^[12]。

3.2 FISH 在血液肿瘤诊断上的应用

FISH 技术弥补了传统方法对间期细胞、复杂核型细胞及染色体微缺失无法诊断的缺点, 因此广泛用于血液肿瘤的研究。Korenberg 和 Rykowski (1988) 发现慢性粒细胞白血病 (CML) 以 9,22 号染色体上的 BCR-ABL 基因融合为遗传性特征, 涉及到 9,22 号染色体相互易位 t(9;22), 以 BCR-ABL 特定的 RNA 序列为探针, 利用多元染色体原位杂交技术对细胞中间期相进行分析, 检测慢性粒细胞白血病, 此法不需对骨髓、血液或实体瘤细胞进行培养, 因而更加快速简便^[13]。FISH 技术也能对急性粒细胞白血病 (AML) M3 中的 PML-RARA 融合基因、M2b 中的 AML1-ETO 融合基因及儿童 B 淋巴细胞急性淋巴细胞白血病 TEL-AML1 融合基因进行检测。对融合基因的检测利于疾病的诊断及估计患者的预后情况。Kraker 等 (1991) 利用 FISH 检查三种病人, 查到了低百分率的 8 号三倍体细胞, 含 12 号染色体三体的慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 病人预后不佳。Drach 等 (1998) 通过荧光原位杂交发现多发性骨髓瘤 (MM) 患者 P53 基因缺失表明其预后较差, 治疗后中位生存期只有 16 个月^[14]。Döhner H 等 (2000) 发现如果在慢性淋巴细胞性白血病患者中检测到 RB1 的缺失则说明患者预后较好, 中位生存期可达到 133 个月^[15]。

3.3 FISH 在产前诊断上的应用

FISH 技术最先 (1993) 在美国将其用于产前诊断, 但当时是用于产前的辅助诊断, 2000 年美国遗传学会宣布可以用于常见染色体数目异常的确诊。Tepperberg 等 (2001) 对 FISH 技术用于产前诊断与核型分析进行了大样本比较, 47312 份有效标本中仅有 9 例出现了假阳性结果, 假阳性率为 0.019%, 有 32 例出现了假阴性结果, 假阴性率为 0.049%。因此说 FISH 进行快速产前诊断具有非常高的灵敏度和特异度, 可用于常见的染色体数目异常的诊断^[16]。

黄浩杰等^[17]用 G 显带染色体 FISH 技术分析了一个习惯性流产女患者的染色体情况, 为其产前诊断提供了条件, 并改进了常规 G 带染色体 FISH 技术。王云华等 (2005) 用多色荧光原位杂交技术结合 G 显带技术和 NOR 技术, 对 2 例患者进行核型诊断, 发现一个患者的额外标记染色体片段来源于 15 号染色体, 患者核型为 47,XY,inv(9)(p11q13),+SMC(15)。另一个患者的核型为 46,XY,der(5)t(4;5)(q27;q35),这对于来源不明的标记染色体和衍生染色体的诊断是非常有帮助的^[18]。崔英霞等用染色体特异性探针与中期染色体杂交技术, 分析诊断了

3 例表型正常但临床上表现为流产、分娩畸形儿的患者的平衡易位的结果, 发现染色体的易位发生的位置和胚胎的存亡存在某种相关性, 对这部分患者特别要重视产前诊断^[19]。黎青等 (2005) 取外周血淋巴细胞、羊水细胞和不适于胚胎移植及冷藏的受精胚胎细胞、骨髓细胞分别制片, 用相应的荧光标记的探针进行原位杂交, 荧光显微镜取图分析。结果表明应用多色荧光原位杂交技术可对染色体进行快速准确的诊断^[20]。

4 小结

自 FISH 技术出现以来, 已经在很多领域得到了广泛应用, 在医学诊断上更是发挥了重要作用。但是该技术也存在一些问题, 仪器设备昂贵、探针制备困难、对操作人员技术要求比较高, 因此还不能普及到一般的临床实验室。随着技术的不断进步, 相信 FISH 技术会在医学诊断上有更强的生命力和应用前景。

参考文献 (References)

- [1] Jiang J M, Gill B S Nonisotopic in situ hybridization and plant genome mapping: the first 10 years[J]. Genome, 1994,37:717-725
- [2] 马莉贞. 荧光原位杂交技术及其应用[J]. 青海大学学报(自然科学版), 2001,19(1):18-21
Ma Li-zhen. Fluorescence in Situ Hybridization Technology and Its Application[J]. Journal of Qinghai University, 2001,19(1):18-21
- [3] Pardue ML, Gall JG. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1969, 64: 2934-2938
- [4] John H, Birnstiel M, Jones K. RNA: DNA hybrids at the cytogenetical level[J]. Nature, 1969, 223: 582-587
- [5] Raap AK, Dirks RW, Jirwa NM, et al. In situ hybridization with hapten-modified DNA probes, in Modern Pathology of AIDS and other retroviral infections[J]. Karger Basel, 1990: 17-28
- [6] Lichter P, Ward DC. Is non-isotopic in situ hybridization finally coming of age[J]. Nature, 1990, 345(6270): 93-94
- [7] 卢建, 张钧, 何蕴韶. 荧光原位杂交及其临床应用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2009,1(1):38-42
Lu Jian, Zhang Jun, He Yun-shao. Fluorescence in situ hybridization and clinical applications[J]. J Mol Diagn Ther, 2009,1(1):38-42
- [8] Lichter P, Cremer T, Broden J. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ hybridization using recombinant DNA libraries[J]. Hum. Genet, 1988,80:224-230
- [9] 梁芳, 王秦秦, 马丽菊等. PP2Ac 突变型肺癌相关基因在染色体区域的定位[J]. 山东医药, 2008,48(27):9-11
Liang Fang, Wang Qin-qin, Ma Li-ju. Chromosome location and regional assignment of the human lung cancer-associated gene related with PP2Ac point mutation[J]. Shandong Medicine, 2008,48(27):9-11
- [10] Cajulis RS, Haines GK, Frias-Hidvegi D, Mcvary K. Interphase cytogenetics as an adjunct in the cytodiagnosis of urinary bladder carcinoma. a comparative study of cytology, flow cytometry and interphase cytogenetics in bladder washes [J]. Anal Quant Cytol Histol, 1994, 16: 1-10
- [11] 蔡心涵, 张颜明, 耿礼义等. 大肠癌新相关基因 HSU17714 的染色体定位研究[J]. 中华肿瘤杂志, 1997,19(03):177-179
Cai Xin-han, Zhang Yan-ming, Geng Li-yi, et al. Assignment of a no-

- vel colorectal cancer associated gene HSU17714 gene to human chromosome band 22q13 by in situ hybridization[J]. Chinese Journal of oncology, 1997,19(03):177-179
- [12] Nishio J. Contributions of cytogenetics and molecular cytogenetics to the diagnosis of adipocytic tumors. J Biomed Biotechnol[J]. Published online 2011,1:524067
- [13] Korenberg JR, Rykowski MC. Human genome organization: Alu, lines, and the molecular structure of metaphase chromosome bands[J]. Cell, 1988,53:391-400
- [14] Drach J, Ackerann J, Fritz E, et al. Presence of a p53 gene deletion in patients with multiple myeloma predicts for short survival after conventional-dose chemotherapy[J]. Blood, 1998, 92: 802-809
- [15] Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia [J]. N Engl J Med, 2000, 343(26): 1910-1916
- [16] Tepperberg J, Pettenati MJ, Rao PN, et al. Prenatal diagnosis using interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): 2-year multicenter retrospective study and review of the literature [J]. Prenat Diagn, 2001, 21: 293-301
- [17] 黄浩杰, 张锡然, 陈宜峰等. 应用荧光原位杂交(FISH)技术研究复杂的染色体易位[J]. 遗传学报, 1996, 23 (5) :338-342
- Huang Hao-jie, Zhang Xi-ran, Chen Yi-feng, et al. A Study on Complicated Chromosome Translocation by Fluorescence in situ Hybridization (FISH) of G-banded Chromosomes [J]. Journal of Genetics and Genomics, 1996, 23 (5):338-342
- [18] 王云华, 崔英霞, 姚兵等. 多色荧光原位杂交技术的临床应用[J]. 临床检验杂志, 2005, 23(6):438-440
- Wang Yun-hua, Cui Ying-xia, Yao Bing, et al. The clinical application of multicolor fluorescence in situ hybridization[J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2005, 23(6):438-440
- [19] 崔英霞, 商学军, 潘淑娟等. 染色体荧光原位杂交技术检测平衡易位的临床应用[J]. 遗传, 1997, 19 (2):9-10
- Cui Ying-xia, Shang Xue-jun, Wang Yong-mei, et al. Clinical Application of Fluorescence in situ Hybridization for Detecting Chromosome-balanced Translocation[J]. Hereditas, 1997, 19 (2):9-10
- [20] 黎青, 孙筱放, 陈欣洁等. 同步多色荧光原位杂交技术的建立及临床应用[J]. 北京大学学报(医学版). 2005, 37(1):45-47
- Li Qing, Sun Xiao-fang, Chen Xin-jie, et al. The establishment and clinical application of multicolor fluorescence in situ hybridization [J]. Journal of Peking University(Health Sciences), 2005, 37(1):45-47
-
- (上接第 997 页)
- [7] 何满西, 孟令祥, 唐勇等. RNA 干扰抑制胰腺癌细胞 SURVIVIN 表达并诱导细胞凋亡的研究[J]. 四川大学学报, 2006, 37(4) :520
- He Man-xi, Meng Ling-xiang, Tang Yong, et al. The Experiment Study on RNAi Inhibiting the Expression of Survivin and Inducing the Apoptosis of Pancreatic Cancer Cells[J]. Journal of Sichuan University Medical Science Edition, 2006, 37(4) :520
- [8] Suzuki A, Ito T, Kawano H, et al. survivin initiates procaspase 3/p21 complex formation as a result of interaction with Cdk4 to resist Fas-mediated cell death [J]. Oncogene, 2000, 19(10) :1346-1353
- [9] 范宇飞, 朱严冰, 孟继昌, 等. Survivin、p53 蛋白与细胞周期蛋白 D1 在乳腺癌中的表达及相关性[J]. 临床误诊误治, 2010, 23(2):102-103
- Fan Yu-fei, Zhu Yan-bing, Meng Ji-chang, et al. Expression and Relationship of Survivin, p53 Protein and CyclinD1 Protein in Breast Carcinoma[J]. Clinical Misdiagnosis & Mistherapy, 2010, 23(2):102-103
- [10] 马兴元. 细胞分裂与凋亡的重要调节因子 Survivin : 一个抗癌新药靶[J]. 生命的化学, 2010, 30(3) :338-343
- Ma Xing-Yuan. A key regulator of mitosis and apoptosis: Survivin, as a novel target for anticancer drug therapeutics [J]. Chemistry of life, 2010, 30(3) :338-343
- [11] Michaela RL, Schmid RM, Schneider G. Inhibition of CDK4 impairs proliferation of pancreatic cancer cells and sensitizes towards TRAIL-induced apoptosis via downregulation of survivin fJ1[J]. Int J Cancer, 2007, 121(1) :66-75
- [12] Reed JC. The survivin sagagoes in vivo [J]. J Clin Invest, 2001, 108 (7) :965-969
- [13] Zhu K, Qin H, Cha SC, et al. Survivin DNA vaccine generated specific antitumor effects in pancreatic carcinoma and lymphoma mouse models[J]. Vaccine, 2007, 25 (46) : 7955-7961
- [14] Watanabe T, Totoki Y, Toyoda A, et al. Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes[J]. Nature, 2008, 453 (7194) : 539-431
- [15] Yang YJ, Wu JJ, Sheu BS, et al. The rdxA gene plays a more major role than frxA gene mutation in high-level metronidazole resistance of Helicobacter pylori in Taiwan[J]. Helicobacter, 2004, 9 :400-407
- [16] Asanuma K, Moriai R, Yajima T, et al. Survivin as a radioresistance factor in pancreatic cancer [J]. Jpn J Cancer Res, 2000, 91(11): 1204-1209
- [17] Lefranc F, Facchini V, Kiss R, et al. Proautophagic drugs a novel means to combat apoptosis-resistant cancers, with a special emphasis on glioblastomas[J]. Oncologist, 2007, 12 :1395-1403
- [18] Lee GH, Joo YE, Koh YS, et al. Expression of survivin in gastric cancer and its relationship with tumor angiogenesis [J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2006, 18(9) :957-963
- [19] Ryan BM. Survivin: a new target for anti-cancer therapy[J]. Cancer Treat Rev, 2009, 35: 553-562