

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2023.01.001

❖ 基础研究 ❖

鼻咽癌组织 STR 基因座变异的研究

马栋祺¹, 杨慧凌², 孟洁敏², 王韵², 徐冬冬^{2,3}, 杜冰^{2,3}

(川北医学院基础医学与法医学院, 1. 组织学与胚胎学教研室; 2. 法医物证教研室; 3. 川北医学院司法鉴定中心, 四川 南充 637000)

【摘要】目的: 探讨鼻咽癌组织 21 个常染色体 STR 基因座及 Amel 基因座等位基因的变异情况。**方法:** 收集 79 例鼻咽癌患者的石蜡组织切片和外周静脉血, 采用 TIANamp FFPE DNA Kit 试剂盒提取石蜡组织切片样本基因组 DNA, Chelex-100 提取血液样本基因组 DNA。通过 AGCU Expressmarker 22 试剂盒进行 PCR 扩增, AB 3500 Genetic Analyzer 检测 STR 型别。**结果:** 79 例鼻咽癌组织中, STR 变异率为 32.9% (26/79), 变异类型包括 Aadd、Anew、LOH、pLOH, 发生率分别是 6.3%、1.3%、6.3%、31.6%。在检测的 STR 基因座中有 19 个位点发生了变异, 变异次数最多的基因座是 D3S1358、D7S820、D19S433 和 Amel 基因未发生变异。STR 变异与鼻咽癌患者的性别、年龄、临床分期等均无明显相关性 ($P > 0.05$)。**结论:** 鼻咽癌组织中 STR 基因座存在变异, 但 STR 变异与患者性别、年龄、临床分期等无明显相关性。鼻咽癌组织中 D3S1358 基因座的变异率高, D7S820、D19S433 和 Amel 基因座未发生变异。

【关键词】 鼻咽癌; 法医学; 短串联重复序列; 基因突变

【中图分类号】 R739.63; R766.3 **【文献标志码】** A

Study on the variation of STR locis in nasopharyngeal carcinoma tissue

MA Dong-qi¹, YANG Hui-ling², MENG Jie-min², WANG Yun², XUN Dong-dong^{2,3}, DU Bing^{2,3}

(1. Department of Histology and Embryology; 2. Department of Forensic Physical Evidence, School of Basic Medical Sciences and Forensic Medicine, North Sichuan Medical Colleg; 3. Judicial Identification Center, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000, Sichuan, China)

【Abstract】Objective: To observe and analyze the allele variation of 21 autosomal STR locis and Amel loci in nasopharyngeal carcinoma. **Methods:** Paraffin embedded tissues and venous blood of 79 patients with nasopharyngeal carcinoma were collected, genomic DNA of paraffin embedded tissues was extracted by TIANamp FFPE DNA Kit, and genomic DNA of blood sample was extracted by Chelex-100. Multiplex amplification was operated by AGCU Expressmarker 22 fluorescence detection kit, and genotype of STR locis were detected by AB 3500 Genetic Analyzer. **Results:** STR variations occurred in 26 of the 79 nasopharyngeal carcinoma cases, with a STR variation rate of 32.9%. The types of mutation were Aadd, Anew, LOH and pLOH, whose occurrence rates were 6.3%, 1.3%, 6.3% and 31.6% respectively. A total of 19 STR locis were mutated in detected STR locis. The locus with the most mutations was D3S1358. The locis which had no mutations were D7S820, D19S433 and Amel. There was no significant correlation between STR variation and gender, age, clinical stage of nasopharyngeal carcinoma ($P > 0.05$). **Conclusion:** There are variations of STR locis in nasopharyngeal carcinoma tissues, but there is no significant correlation between STR variation and gender, age, and clinical stage. The mutation rate of D3S1358 loci is high in nasopharyngeal carcinoma, but D7S820, D19S433 and Amel loci do not have mutation.

【Key words】 Nasopharyngeal carcinoma; Forensic science; Short tandem repeats; Genetic alteration

短串联重复序列 (short tandem repeats, STR) 又称微卫星 DNA, 是由 2~6 个核苷酸组成的简单串联排列的 DNA 序列, 在人群中呈高度多态性, 遵循孟德尔遗传规律, 具有较强的遗传稳定性。但是, 在肿瘤组织中, 由于基因组的突变, STR 变异的发生率显著高于正常组织。肿瘤组织 STR 基因座的异常分型主要包括 4 类^[1], 即等位基因增加 (additional

allele, Aadd)、新等位基因 (new allele, Anew)、完全杂合性丢失 (complete lost of heterozygosity, LOH) 和部分杂合性丢失 (partial lost of heterozygosity, pLOH)。多项研究^[2-10]表明肿瘤组织中存在 STR 变异, 因此, 在肿瘤组织中, 采用 STR 基因座进行个体同一认定时, 不能完全照搬以往的评价体系作出肯定或排除的评判结果。

基金项目: 四川省教育厅科研项目 (08ZC048); 南充市科学技术与知识产权局项目 (16YFZJ0131); 川北医学院校级科研发展项目 (CBY22-QNA36)

作者简介: 马栋祺 (1990-), 男, 硕士, 助理实验师。E-mail: 1303793438@qq.com

通讯作者: 杜冰, 教授。E-mail: dbing04@163.com

鼻咽癌作为头颈部恶性肿瘤,发病率高,是四川、广东等地区常见的恶性肿瘤之一。本研究选取四川东北地区鼻咽癌组织作为研究对象,采用 21 个常染色体 STR 基因座及 Amel 基因座分型检测,旨在发现鼻咽癌组织中法医学常用 STR 基因座的变异类型及变异规律。

1 资料与方法

1.1 一般资料

收集 2016 年 9 月至 2017 年 8 月川北医学院附属医院收治的 79 例经病理学诊断确诊为鼻咽癌患者的肿瘤组织及其对照组织。本研究经伦理委员会批准,患者均知情同意。患者的肿瘤组织来源于病理科石蜡包埋组织,对照组织为同一个体的外周静脉血。鼻咽癌患者中有 61 例收集到临床病理资料,包括患者的性别、年龄、临床分期等,其中男性 42 例,女性 19 例,年龄 20~80 岁,服从正态分布,平均年龄 50 岁。患者临床分期为 I~IV 期(2008 广州分期^[11]),其中 I 期 1 例,II 期 5 例,III 期 31 例,IV 期 24 例。

1.2 DNA 提取

肿瘤组织基因组 DNA 提取:采用 TIANamp FF-PE DNA Kit 试剂盒提取石蜡切片组织样本基因组 DNA,操作步骤按说明书进行。

对照组织基因组 DNA 提取:采用 Chelex-100 法提取外周静脉血样本基因组 DNA,按常规操作步骤进行。

1.3 扩增及电泳

采用 AGCU Expressmarker 22 复合扩增系统(D2S441、D2S1338、vWA、D3S1358、PentaE、D5S818、D6S1043、TPOX、D7S820、D8S1179、TH01、D10S1248、D12S391、CSF1PO、D13S317、PentaD、D16S539、D18S51、FGA、D19S433、D21S11 和 Amel 性别基因座)对样本 DNA 进行复合扩增。反应体系 10 μ L,含模板 DNA 2 μ L,Reaction Mix 4 μ L,EX22 Primers 2 μ L,热启动 C-Taq 酶 0.4 μ L,sdH₂O 1.6 μ L。反应体系经 95 $^{\circ}$ C 变性 2 min,以 94 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 60 s,72 $^{\circ}$ C 60 s 循环 10 次,再以 90 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 60 s,72 $^{\circ}$ C 60 s 循环 18 次,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物经 AB 3500 Genetic Analyzer 电泳分型, GeneMapper ID-X 软件分析图谱,统计分型结果。

对比同一个体肿瘤组织及其对照组织的 STR 分型结果,观察鼻咽癌组织 STR 基因座等位基因的变异情况,出现变异的样本再重复检验 1 次进行确认。其中,部分杂合性丢失的评判标准以等位基因的峰高或峰面积的比值 <0.5 或 >2.0 为准^[12]。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。计数资料采用 $[n(\%)]$ 表示,组间比较采用 χ^2 检验;等级资料以频数表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 鼻咽癌组织个体变异统计

通过比较鼻咽癌组织和对照组织的分型结果,79 例鼻咽癌组织中有 26 例发生了 STR 变异,发生率为 32.9%。其中有 5 例鼻咽癌组织发生 Aadd,1 例出现 Anew,5 例发生 LOH,25 例发生 pLOH。其中,Aadd、Anew、LOH 等三种变异可导致 STR 基因型改变^[13](STR genotype alteration,STRGA),本研究鼻咽癌组织 STRGA 的发生率为 8.9%。同一个体可同时发生多种类型 STR 变异。见表 1。

表 1 鼻咽癌组织 STR 变异类型的发生率

| 突变类型 | 样本例数 | 发生率(%) |
|------|------|--------|
| Aadd | 5 | 6.3 |
| Anew | 1 | 1.3 |
| LOH | 5 | 6.3 |
| pLOH | 25 | 31.6 |

2.2 鼻咽癌组织 STR 基因座变异统计

经 21 个常染色体 STR 基因座及 Amel 基因座的分型检测,鼻咽癌组织中有 19 个 STR 位点发生了变异。其中,Penta E、D2S441、TPOX、D2S1338、Penta D、D10S1248、D5S818 等 7 个位点只发生了 pLOH,未引起基因型改变。D3S1358、D13S317、D16S539、TH01、CSF1PO、vWA、D21S11、D18S51、D6S1043、D8S1179、D12S391、FGA 等 12 个 STR 基因座的变异导致基因型发生了改变。出现变异次数最多的基因座是 D3S1358,共发生了 12 次变异,包括两次 LOH 和 10 次 pLOH。D7S820、D19S433 和 Amel 基因座未发生变异。同一个体多个基因座可同时发生变异。见表 2。

表 2 79 例鼻咽癌组织中等位基因变异统计

| 基因座 | STR 变异类型 | | | | 合计 |
|----------|----------|------|-----|------|----|
| | Aadd | Anew | LOH | pLOH | |
| D3S1358 | 0 | 0 | 2 | 10 | 12 |
| D13S317 | 0 | 0 | 1 | 7 | 8 |
| D7S820 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| D16S539 | 0 | 0 | 2 | 4 | 6 |
| Penta E | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| D2S441 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| TPOX | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| TH01 | 0 | 0 | 1 | 2 | 3 |
| D2S1338 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 |
| CSF1PO | 1 | 0 | 1 | 2 | 4 |
| Penta D | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| D10S1248 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| D19S433 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| VWA | 0 | 0 | 1 | 4 | 5 |

续表 2

| 基因座 | STR 变异类型 | | | | 合计 |
|---------|----------|------|-----|------|----|
| | Aadd | Anew | LOH | pLOH | |
| D21S11 | 1 | 1 | 0 | 1 | 3 |
| D18S51 | 1 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| D6S1043 | 2 | 0 | 1 | 2 | 5 |
| D8S1179 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| D5S818 | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 |
| D12S391 | 0 | 0 | 1 | 2 | 3 |
| FGA | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 |
| Amel | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 合计 | 5 | 2 | 11 | 50 | 68 |

2.3 鼻咽癌组织 STR 变异在性别、年龄、临床分期的分布

61 例鼻咽癌患者临床病理资料中,STR 变异在性别、年龄、临床分期的分布比较,差异无统计学意

义($P>0.05$),即鼻咽癌组织 STR 变异与患者的性别、年龄、临床分期等资料无明显相关性。见表 3。

表 3 鼻咽癌 STR 变异结合临床资料的分析 [n(%)]

| 临床资料 | 例数 | STR 变异 | STR 未变异 | χ^2 值 | P 值 |
|--------|----|------------|------------|------------|-------|
| 性别 | | | | 0.949 | 0.330 |
| 男 | 42 | 14 (33.33) | 28 (66.67) | | |
| 女 | 19 | 4 (21.05) | 15 (78.95) | | |
| 年龄(岁) | | | | <0.001 | 0.985 |
| <50 | 27 | 8 (29.63) | 19 (70.37) | | |
| ≥50 | 34 | 10 (29.41) | 24 (70.59) | | |
| 临床分期 | | | | 0.329 | 0.566 |
| I~II 期 | 6 | 3 (50.00) | 3 (50.00) | | |
| III 期 | 31 | 8 (25.81) | 17 (70.83) | | |
| IV 期 | 24 | 7 (29.17) | 23 (74.19) | | |

2.4 STR 变异图谱示例

STR 变异图谱示例见图 1-图 4。

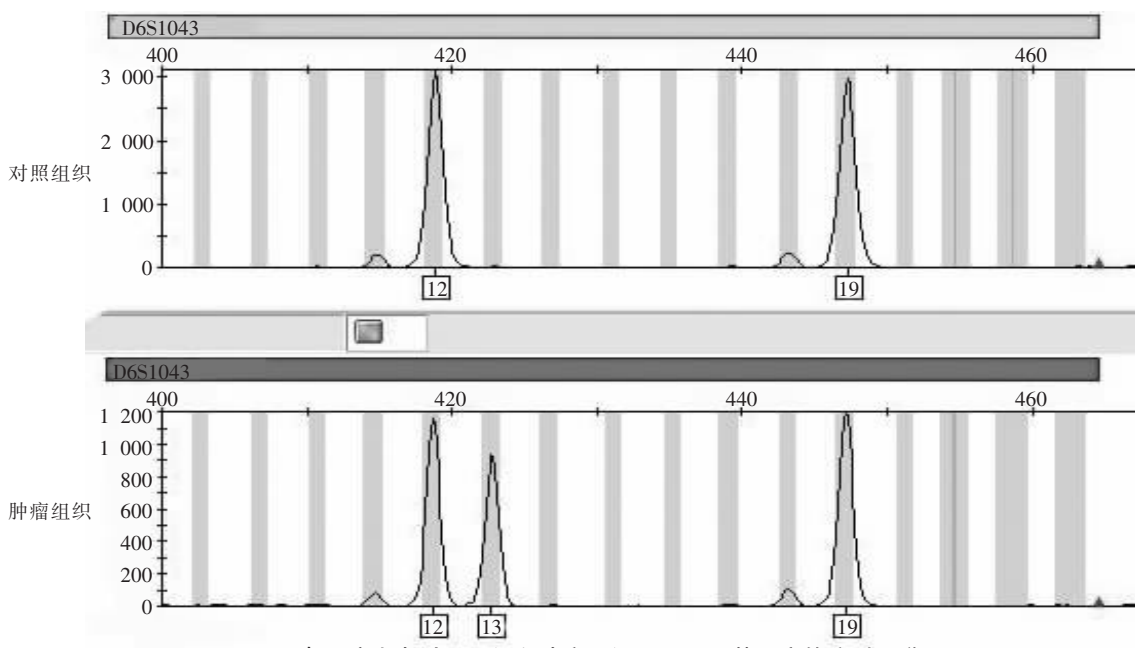


图 1 鼻咽癌患者对照组织和肿瘤组织 D6S1043 基因座的分型图谱

对照组织的基因型是 12-19,肿瘤组织的基因型是 12-13-19,增加了等位基因 13,记录为 Aadd。

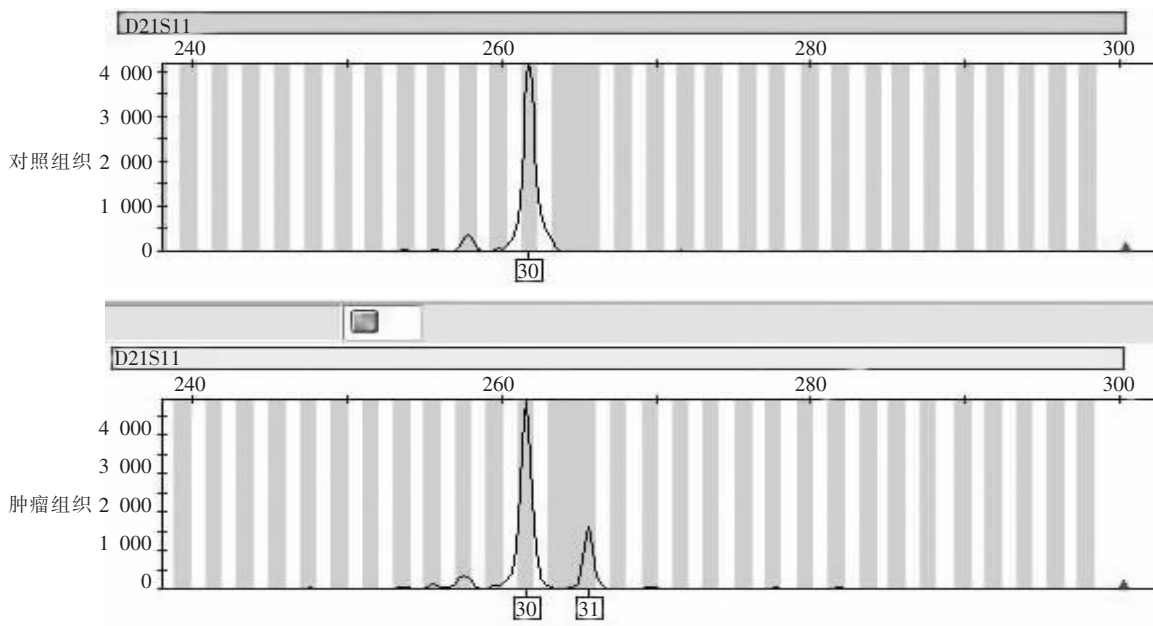


图 2 鼻咽癌患者对照组织和肿瘤组织 D21S11 基因座的分型图谱

对照组织的基因型是 30-30,肿瘤组织的基因型是 30-31,出现了新等位基因 31,记录为 Anew。

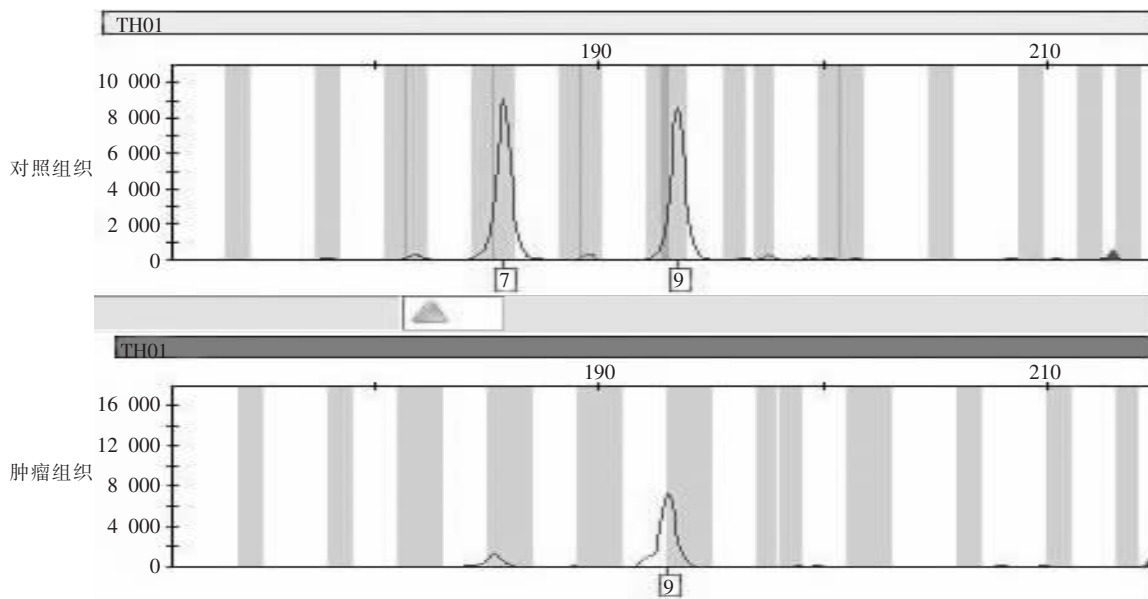


图 3 鼻咽癌患者对照组织和肿瘤组织 TH01 基因座的分型图谱

对照组织的基因型是 7-9, 肿瘤组织的分型结果是 9-9, 丢失了等位基因 7, 记录为 LOH。

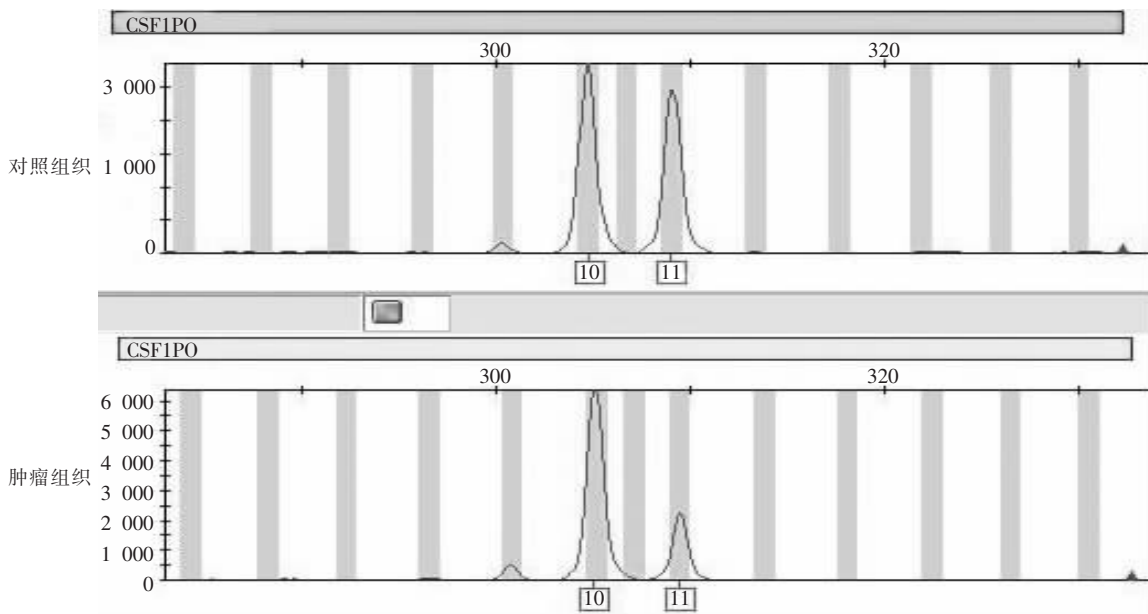


图 4 鼻咽癌患者对照组织和肿瘤组织 CSF1PO 基因座的分型图谱

对照组织和肿瘤组织的基因型均是 10-11, 但肿瘤组织等位基因 11 的峰值相比于等位基因 10 的峰值显著降低。计算该样本对照组织和肿瘤组织等位基因峰值或峰面积的比值比, 结果 <0.5 或 >2.0 , 记录为 pLOH。

3 讨论

现代肿瘤学说中, 癌症是在分子水平出现多次的遗传学改变, 肿瘤组织 STR 变异是遗传不稳定性 的体现。本研究发现, 鼻咽癌组织 STR 变异的发生 率为 32.9%。变异类型包括 Aadd、Anew、LOH、 pLOH, 其发生率分别是 6.3%、1.3%、6.3%、 31.6%。其中, Aadd、Anew、LOH 等三种变异会导 致基因型发生改变, 对 DNA 鉴定结果产生影响。此 外, 本研究中鼻咽癌组织 STRGA 发生率是 8.9%, 因此涉及该类肿瘤组织的 DNA 检案鉴定, 出现个别 位点基因型不匹配时, 宜慎重下排除结论。不同肿 瘤组织中 STR 变异存在差别。Li 等^[14] 在结直肠癌

组织中发现 STR 变异的发生率分别是 Aadd 0.89%、Anew 0.57%、LOH 0.89%、pLOH 8.93%; 李璐等^[15] 报道甲状腺乳头状癌组织中 STR 变异的 发生率分别是 Aadd 0.11%、Anew 0.74%、LOH 0.32%、pLOH 1.17%; Zhang 等^[16] 在肺癌组织中发现 3 种变异类型, 其发生率分别是 Aadd 13.3%、LOH 13.3%、pLOH 46.7%。肿瘤组织中 Aadd、Anew 的 发生率较低, pLOH 发生率较高, 这可能与它们的发生 机制不同有关。另外, 肺癌组织 STR 变异发生率较 高, 鼻咽癌 STR 变异发生率次之, 结直肠癌、甲状腺 乳头状癌组织 STR 变异发生率较低, 提示不同肿瘤 组织的基因组稳定性可能存在差异。

本研究选取的 22 个 STR 位点有 19 个发生了

变异,其中变异次数最多的 STR 基因座是 D3S1358,与既往研究^[17-18]结论一致,钟巧娥等^[17]在人肺癌组织 STR 变异的研究中发现,变异次数最多的基因座是 D3S1358 和 CSF1PO;Poetsch 等^[18]在四种不同类型肿瘤中发现,D3S1358、D21S11、D18S51 和 FGA 基因座表现了较高变异率。D3S1358 的变异率较其它位点高,提示 D3S1358 在肿瘤组织中稳定性较差,不适合用于肿瘤组织的个体识别及亲权鉴定。张相国等^[19]对广东地区鼻咽癌组织的分型检测中发现,D18S51 和 D16S539 等 2 个基因座发生了微卫星不稳定(microsatellite instability, MSI),MSI 的发生率为 7.3%。本研究 D18S51、D21S11、CSF1PO、D6S1043、D8S1179 等 5 个位点发生了 MSI,MSI 的发生率为 7.6%,且 D16S539 基因座的变异类型是 LOH 和 pLOH,这与张相国等^[19]的报道不同。分析原因可能是与研究对象的地域、遗传背景、样本数量、选用的 STR 位点等不同有关。本研究中,D7S820、D19S433 和 Amel 基因座未发生变异,提示其在鼻咽癌组织中的稳定性较好,后续可扩大肿瘤样本量及样本类型,探究其在肿瘤组织 DNA 鉴定中的应用价值。

另外,本研究检测用的 STR 位点有 19 个均发生了变异,且 STR 变异与鼻咽癌患者的性别、年龄、临床分期等无明显相关性,与既往研究基本一致。张相国等^[20]研究 MSI 与鼻咽癌的临床相关性时也发现,鼻咽癌 MSI 的发生与患者性别、年龄、临床分期等无显著相关性。然而,Zhang 等^[16]、马若翔等^[21]在肺癌组织中的研究报道称,STR 变异与患者的年龄及肺癌的分期有关,年龄越大,进展期越深的患者变异频率越高。Zhen 等^[22]对甲状腺乳头状癌的研究发现,STR 变异与患者的性别无关,但与患者的年龄有显著的相关性。因此,尽管此类 STR 位点处于非编码区,但在某些肿瘤组织中其变异仍然可能与疾病存在关系,具有一定的临床探究价值。

综上,鼻咽癌组织中 STR 基因座变异与患者性别、年龄、临床分期等无明显相关性。鼻咽癌组织中 D3S1358 基因座的变异率高,而 D7S820、D19S433 和 Amel 基因座未发生变异。

参考文献

[1] Page K, Grraham EAM. Cancer and forensic microsatellites[J]. Forensic Science Medicine and Pathology, 2008, 4(1): 60-66.

[2] Pelotti S, Ceccardi S, Alù M, et al. Cancerous tissues in forensic genetic analysis[J]. Genetic Testing, 2007, 11(4): 397-400.

[3] 方建新,李成涛,肖立. 13 个 STR 位点在人消化系统肿瘤组织中的变异分析[J]. 法医学杂志, 2007, 23(4): 280-282.

[4] Trimeche M, Braham H, Ziadi S, et al. Investigation of allelic imbalances on chromosome 3p in nasopharyngeal carcinoma in Tunisia; high frequency of microsatellite instability in patients with early-onset of the disease[J]. Oral Oncology, 2008, 44(8): 775-783.

[5] Filoglu G, Bulbul O, Raymoglu G, et al. Evaluation of reliability on STR typing at leukemic patients used for forensic purposes[J]. Molecular Biology Reports, 2014, 41(6): 3961-3972.

[6] Liu Y, Li L, Li CT, et al. Allelic alterations of STRs in archival paraffin embedded tissue as DNA source for paternity testing[J]. Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 2009, 2(1): 12-13.

[7] 孙丽娟,李淑瑾,付光平,等. 妇科肿瘤和乳腺癌组织常染色体和 X 染色体 STR 的突变分析[J]. 中国法医学杂志, 2017, 32(4): 350-353, 358.

[8] Much M, Buza N, Hui P. Tissue identity testing of cancer by short tandem repeat polymorphism: Pitfalls of interpretation in the presence of microsatellite instability[J]. Human Pathology, 2014, 45(3): 549-555.

[9] 刘奇,张海霞,董婷婷,等. 甲状腺乳头状癌组织常染色体和性染色体 STR 基因座变异分析[J]. 癌变. 畸变. 突变, 2019, 31(5): 373-378, 384.

[10] Chen AQ, Zhang SH, Li JX, et al. Detecting genetic hypermutability of gastrointestinal tumor by using a forensic STR kit[J]. Frontiers of Medicine, 2020, 14(1): 101-111.

[11] 陈韵彬,梁碧玲. 鼻咽癌 2008 分期方案解读[J]. 中华反射学杂志, 2009, 43(10): 1119-1120.

[12] 李成涛,赵书民,张素华,等. 肿瘤组织中部分杂合性丢失判定标准的适用性评估[J]. 法医学杂志, 2009, 25(6): 417-420.

[13] 赵书民,李成涛,张素华,等. 共有基因座数和等位基因数用于结直肠癌组织的身源认定[J]. 法医学杂志, 2009, 25(6): 412-416.

[14] Li CT, Zhao SM, Fang JX, et al. Evaluation of reliability of STR typing in human colon carcinomas tissues used for identification purpose[J]. Forensic Science International, 2009, 2(1): 8-9.

[15] 李璐,刘晓龙,张哈,等. 甲状腺乳头状癌 STR 基因座突变分析[J]. 济南医学院学报, 2019, 42(3): 185-188, 195.

[16] Zhang P, Zhu Y, Li Y, et al. Forensic evaluation of STR typing reliability in lung cancer[J]. Legal Medicine (Tokyo), 2018, 30: 38-41.

[17] 钟巧娥,王景舟,王红梅,等. 人肺癌组织 19 个常染色体 STR 及性别基因座变异分析[J]. 中国法医学杂志, 2015, 30(1): 45-48.

[18] Poetsch M, Petersmann A, Woenckhaus C, et al. Evaluation of allelic alterations in short tandem repeats in different kinds of solid tumors—possible pitfalls in forensic casework[J]. Forensic Science International, 2004, 145(1): 1-6.

[19] 张相国,李警锋,何宗师. 鼻咽癌微卫星不稳定性初步探讨[J]. 临床和实验医学杂志, 2013, 12(12): 905-909.

[20] 张相国,李警锋,何宗师,等. 鼻咽癌微卫星不稳定性与其预后相关性的临床研究[J]. 实用癌症杂志, 2014, 29(12): 1522-1525.

[21] 马若翔,李永国,朱英,等. 肺癌组织中 STR 基因座变异规律的研究[J]. 中国癌症杂志, 2017(5): 353-358.

[22] Zhen D, Lu L, Xia K, et al. Evaluation of allelic alterations in short tandem repeats in papillary thyroid cancer[J]. Molecular Genetics & Genomic Medicine, 2020, 8(4): e1164.

(收稿日期: 2022-04-14

修回日期: 2022-08-20)