

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2024.10.003

❖ 基础研究 ❖

食管鳞癌组织中 STR 基因座和 Amelogenin 基因座的变异分析

杨慧凌^{1,3}, 江继平⁴, 马栋棋¹, 范庆炜^{1,3}, 徐冬冬^{1,3}, 付茂勇², 杜冰^{1,3}

(川北医学院, 1. 基础医学与法医学院; 2. 附属医院; 3. 司法鉴定中心, 四川南充 637000; 4. 四川省公安厅物证鉴定中心, 四川成都 610031)

【摘要】目的: 探究食管鳞癌组织中 21 个常染色体 STR 基因座及 Amelogenin 基因座变异情况。**方法:** 收集 89 例食管鳞癌患者的新鲜肿瘤组织及对照组织, 采用酚氯仿法提取组织基因组 DNA。利用 AGCU Expressmarker 22 荧光检测试剂盒对提取的基因组 DNA 进行 PCR 扩增, AB3500 遗传分析仪对 PCR 扩增产物进行毛细管电泳, 通过 GeneMapper[®] ID-X 软件进行 STR 分型。**结果:** 在 89 例食管鳞癌患者肿瘤样本中, 检出 26 例 STR 基因型变异 (STR_{CA}), 占样本总数的 29%, 新等位基因 (A_{new})、增加的等位基因 (A_{add})、完全杂合性丢失 (cLOH) 和部分杂合性丢失 (pLOH) 4 种变异类型均被检出, 同时观察到 D21S11、D12S391、vWA、FGA 和 D18S51 基因座发生 STR 基因型变异频次最高, 仅在 D13S317、D2S441、TH01、D10S1248 和 Amelogenin 等 5 个基因座未观察到 STR 基因型变异; 本次研究采用的 21 个常染色体基因座中有 17 个出现 STR 基因型变异, 且观察到 2 例肿瘤组织在多个基因座检出 STR 基因型变异。**结论:** 法医 DNA 鉴定中常用的 17 个常染色体 STR 基因座用于食管鳞癌肿瘤组织的个体识别时, 出现和对照组织分型不一致的结果, 应慎重下结论。同时, STR 遗传标记在食管鳞癌的临床诊疗中有一定应用潜力。

【关键词】 食管鳞癌; STR 基因座; 个体识别; 临床诊疗

【中图分类号】 R89 **【文献标志码】** A

Analysis of STR loci and Amelogenin locus variants in esophageal squamous cell carcinoma tissues

YANG Hui-ling^{1,3}, JIANG Ji-ping⁴, MA Dong-qi¹, FAN Qing-wei^{1,3}, XU Dong-dong^{1,3}, FU Mao-yong², DU Bing^{1,3}

(1. School of Basic Medicine and Forensic Medicine, North Sichuan Medical College; 2. Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College; 3. Judicial Appraisal Center, North Sichuan Medical College, Nanchong 637000; 4. Evidence Identification Center, Sichuan Public Security, Chengdu 610031, Sichuan, China)

【Abstract】Objective: To investigate the variation of 21 autosomal STR loci and Amelogenin locus (sex locus) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). **Methods:** Fresh tumor tissues and corresponding control tissues were collected from 89 patients with esophageal squamous cell carcinoma. Genomic DNA from these tissues was extracted using the phenol-chloroform method. The extracted genomic DNA was PCR-amplified using the AGCU Expressmarker 22 fluorescent detection kit, and the PCR products were analyzed by capillary electrophoresis using an AB3500 Genetic Analyzer. STR typing was performed using GeneMapper[®] ID-X software. **Results:** Among the 89 esophageal squamous carcinoma tissue samples, STR genotype variations (STR_{CA}) were detected in 26 cases, accounting for 29% of the samples. Four types of variations were observed: new alleles (A_{new}), additional alleles (A_{add}), complete loss of heterozygosity (cLOH), and partial loss of heterozygosity (pLOH). The highest frequency of STR variations was observed at the D21S11, D12S391, vWA, FGA, and D18S51 loci. No STR genotype variations were observed at the D13S317, D2S441, TH01, D10S1248, and Amelogenin loci of the 21 autosomal loci studied, STR genotype alterations were found in 17, and 2 cases showed STR genotype alterations at multiple loci. **Conclusion:** Caution should be exercised when concluding individual identification in esophageal squamous cell carcinoma tissues using the 17 autosomal STR loci commonly employed in forensic DNA profiling, as inconsistent typing results occurred compared to control tissues. Additionally, STR genetic markers exhibit potential applications in the clinical diagnosis and treatment of esophageal squamous cell carcinoma.

【Key words】 Esophageal squamous cell carcinoma; STR loci; Individual identification; Clinical diagnosis and treatment

基金项目: 四川省基层卫生事业发展研究中心 (SWFZ22-Q-59); 川北医学院青年项目 (CBY22-QNA25)

作者简介: 杨慧凌 (1993-), 女, 硕士, 助教。E-mail: qpyxkjrhx@sina.com

通讯作者: 杜冰, 博士, 教授。E-mail: dbing04@163.com

目前在法医学个体识别领域中,短串联重复序列(short tandem repeat, STR)作为继可变数目串联重复序列(variable number of tandem repeats, VNTR)后的法医 DNA 遗传标记,具有多态性良好、易于 PCR 扩增、稳定遗传和成熟庞大的数据库等优点,是目前应用最广泛和最主流的遗传标记^[1]。同时,基于毛细管电泳(capillary electrophoresis, CE)技术开发的一系列 STR 复合扩增试剂盒已经被广泛应用于个体识别、亲缘关系鉴定、失踪人口身份识别、家系搜索等法医常见领域,并且已经取得显著成效^[2]。此外,在司法鉴定实际检案中,有时会遇到肿瘤组织样本这类特殊检材,如患者怀疑医院误诊或者保险公司怀疑投保人利用非本人肿瘤样本进行保险欺诈,要求对某个体的肿瘤组织和正常组织进行同一性认定。然而,在肿瘤发生过程中,肿瘤组织受到肿瘤细胞的异常增殖影响,可能会导致同一个体的肿瘤组织和正常组织出现 STR 分型不一致的现象,进而影响对鉴定结果准确性的判断。有研究^[3-4]表明,肿瘤组织中最常见的 STR 变异主要有以下 4 种类型:新等位基因(New alleles, A_{new})、增加的等位基因(Additional alleles, A_{add})、完全杂合性丢失(Complete lost heterozygosity, cLOH)和部分杂合性丢失(Partial lost heterozygosity, pLOH),前 3 种类型又被称为 STR 基因型变异(STR genotype alteration, STR_{GA}),在检测结果中发生 A_{new} 、 A_{add} 、cLOH 三种类型的任意一种,都会出现同一个体的肿瘤组织和正常组织 STR 分型不一致,在个体识别中不能计算其匹配概率,导致无法给出准确判断。而 pLOH 仅表现为杂合子峰高比失衡的程度不同,并不影响对 STR 分型结果进行判读,故不是法医学者关注的重点。

食管癌是我国高发特色恶性肿瘤,鳞癌是其最常见的病理类型,占有病例的 85.8%^[5]。据 2016 中国肿瘤登记年报报告,食管癌在四川省恶性肿瘤发病例数顺位和死亡例数顺位均位于第 3 位,是四川省最常见的恶性肿瘤之一^[6],而盐亭、南充、广元等县市是中国食管癌高发区^[7]。因此本研究选取川东北地区南充市某医院食管鳞癌组织作为研究对象,采用现目前个体识别中应用较为普遍的 AGCU Expressmarker 22 荧光检测试剂盒进行 PCR-STR 复合扩增和 DNA 分型,并使用不同的方法对发生变异的 STR 基因座进行验证,探索食管鳞癌组织中常染色体 STR 和 Amelogenin 基因座的变异情况和变异规律。

1 材料与方 法

1.1 样本来源

收集 2017 年 1 月 1 日至 2018 年 12 月 31 日南

充市某医院经病理学确诊为食管鳞癌且未进行放疗的 89 名患者的新鲜肿瘤组织和对照组织,所有样本均冷冻保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱。本研究获得伦理委员会批准,患者均知情同意。

1.2 主要试剂

AGCU Expressmaker22 荧光检测试剂盒,购于无锡中德美联公司;PowerPlex[®] 21 System 复合扩增试剂盒购于 Promega 公司;Tris-HCL 试剂购于 Beyotime;EDTA 购于成都科龙化工;10% SDS 溶液、饱和酚溶液、氯仿溶液和异戊醇溶液(24:1)均购于生工生物工程有限公司。

1.3 方 法

1.3.1 基因组 DNA 提取、PCR 扩增与毛细管电泳

肿瘤组织和对照组织均采用酚氯仿法提取基因组 DNA^[8],提取后样品保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。采用 AGCU Expressmaker 22 荧光检测试剂盒进行 PCR 复合扩增,扩增产物经 AB3500 遗传分析仪电泳分型, GeneMapper[®] ID-X 软件收集样本 STR 基因座和 Amelogenin 基因座分型结果。

1.3.2 STR 基因座变异验证 采用同一试剂盒重复性实验、不同试剂盒扩增电泳和单基因座扩增 Sanger 测序 3 种方法对 STR_{GA} 进行结果验证。

1.4 统计学分析

应用 SPSS23.0 软件进行统计分析。用计数法统计各种变异类型的个体 STR 突变次数和基因座水平的 STR 突变次数,用 χ^2 检验比较不同变异类型检出次数。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 同一个体肿瘤组织和对照组织 STR 基因座及 Amelogenin 基因座分型结果

2.1.1 采用 AGCU Expressmarker 22 荧光检测试剂盒检测结果 与对照组织相比较,在肿瘤组织中观察到 4 种 STR 变异类型: A_{add} 、 A_{new} 、cLOH 和 pLOH。见图 1。

2.1.2 STR_{GA} 验证 (1)PowerPlex[®] 21 System 复合扩增试剂盒验证 STR_{GA} 。采用 PowerPlex[®] 21 System 试剂盒扩增发生 STR_{GA} 的样本,若变异基因座分型结果与 AGCU Expressmarker 22 试剂盒的分型结果一致,则确定 STR 变异的发生。如某患者肿瘤组织(T)和对照组织(N)采用以上两个试剂盒进行 PCR 复合扩增,在 CSF1PO 基因座,肿瘤组织基因座分型均为 10/11/12,癌旁对照组织基因座分型均为 10/11。见图 2。(2)Sanger 测序验证 STR_{GA} 。对发生 STR_{GA} 变异的部分样本进行单基因座 PCR 扩增后测序,若测序得到的等位基因序列、重复次数与试剂盒

分型结果一致,则可进一步确认变异的产生。例如某患者肿瘤组织和对照组织在 D16S539 基因座上分型分别是 9/12/13 和 9/12,对肿瘤组织单基因座扩增后,回收目的条带 DNA,进行 Sanger 测序(测序

工作由上海生工生物有限公司完成),测序结果显示 3 条目的条带重复序列、重复次数和等位基因分型均与试剂盒完全一致。见图 3 及图 4。



图 1 A_{add}、A_{new}、cLOH、pLOH 四种突变类型(T.肿瘤组织;N.对照组织)

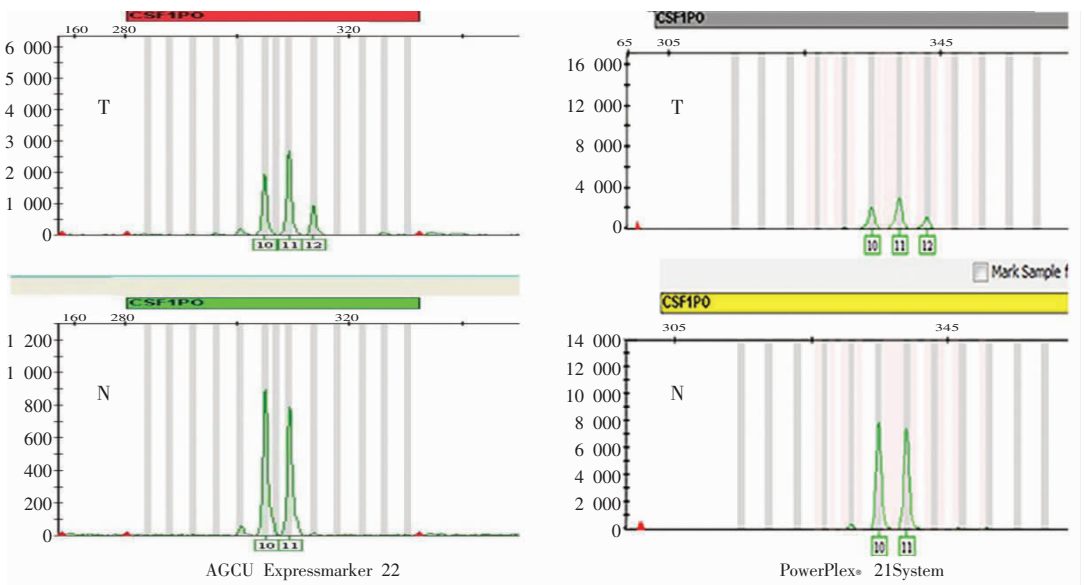


图 2 某患者肿瘤组织和对照组织在两个试剂盒中 CSF1PO 分型图

2.2 STR 基因座和 Amelogenin 基因座变异统计

在基因座水平,共观察到 38 次 STR_{GA} 和 241 次 pLOH 现象,其中 A_{add}、A_{new}、cLOH 分别发生 30 次、7

次和 1 次,STR_{GA} 总变异率为 1.94%,并且 3 种 STR_{GA} 突变率差异具有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

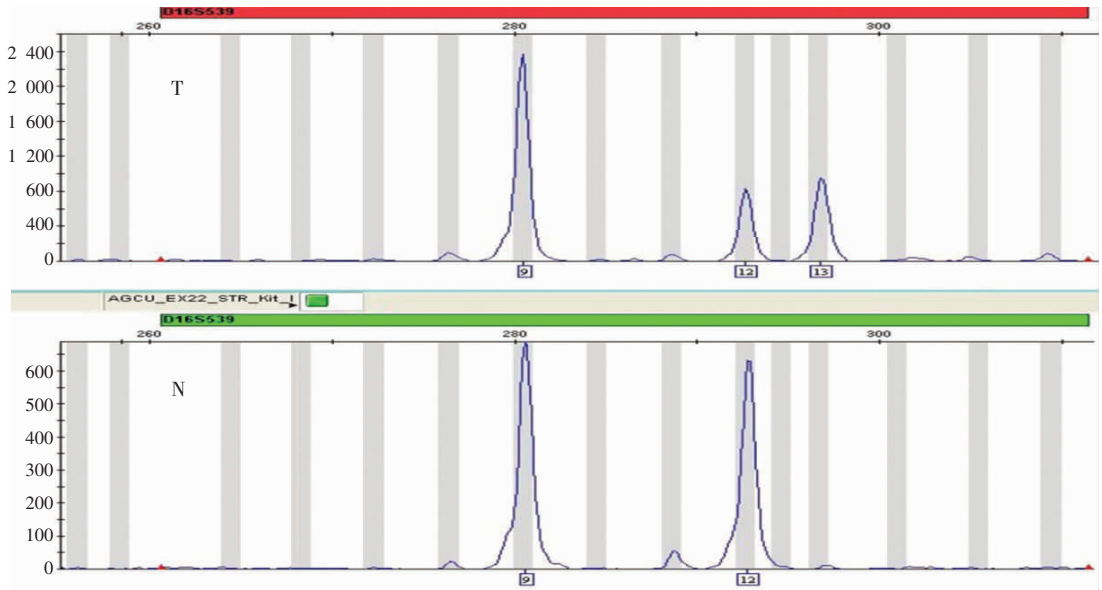


图 3 某患者肿瘤组织和对照组织 D16S539 基因座等分型图

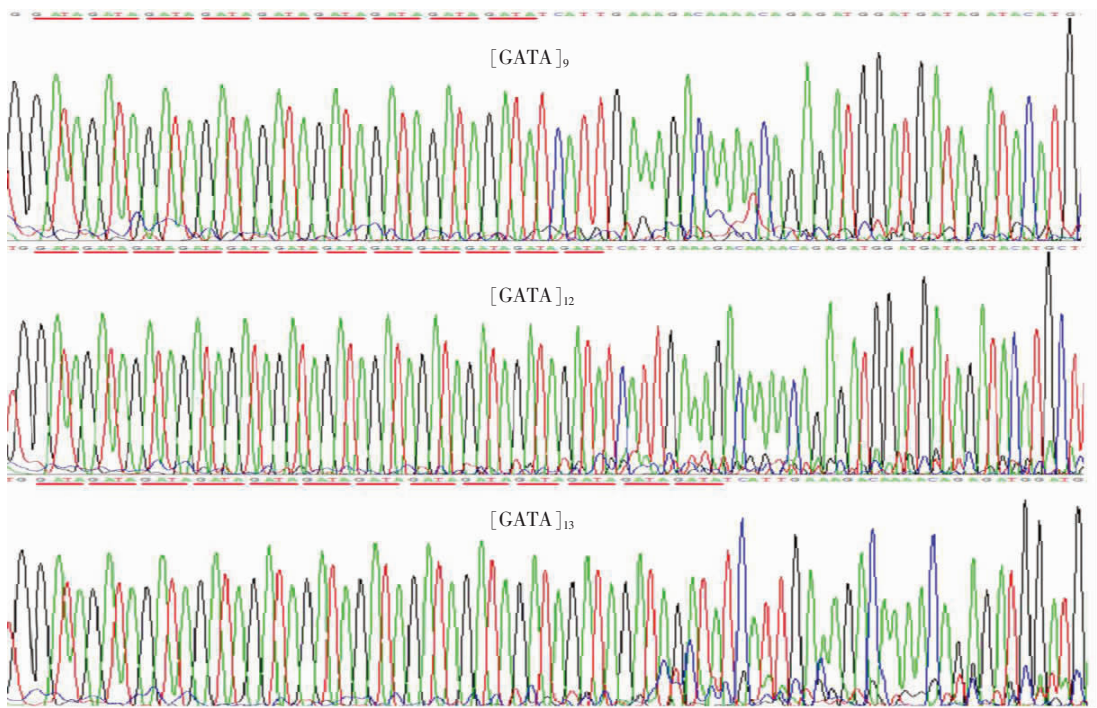


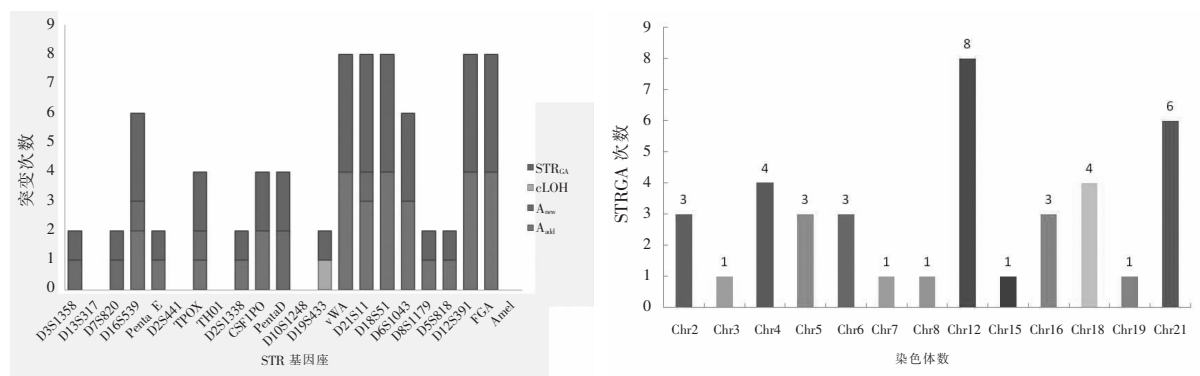
图 4 测序结果图

表 1 4 种变异类型的突变检出率 [n (%)]

突变类型	STR 突变	95% CI	
		上限	下限
pLOH	214 (10.92)	12.31	9.54
cLOH	1 (0.10)	0.30	0.10
A _{add}	30 (1.53)	2.08	0.99
A _{new}	7 (0.35)	0.62	0.09
STR _{CA}	38 (1.94)	2.55	1.33

2.3 STR_{CA} 在基因座及染色体上的分布

本研究中, D2S1338、vWA、D3S1358、PentaE、D5S818、D6S1043、TPOX、D7S820、D8S1179、D12S391、CSF1PO、PentaD、D16S539、D18S51、FGA、D19S433、D21S11 等 17 个基因座均检出 STR_{CA}, 其中 D21S11、D12S391、vWA、FGA 和 D18S51 基因座均发生 4 次 STR_{CA}。发生 STR_{CA} 的基因座分布在 13 条常染色体上, D12S391 和 vWA 基因座所在的 12 号染色体发生频次最多, 共检出 8 次。见图 5。

图5 STR_{CA}在基因座和染色体上的分布

2.4 STR_{CA}个体水平统计

在89例食管鳞癌样本中,有26例检出不同于对照组织的STR_{CA},个体变异率是29%。同一个体肿瘤组织可在多个基因座检出STR_{CA}。

3 讨论

肿瘤组织作为个体识别的特殊生物检材来源之一,其最常见于医疗纠纷的案件中。已有研究表明^[9-11],恶性肿瘤组织的DNA会出现微卫星不稳定(Microsatellite Instability, MSI)和杂合性缺失(Loss of heterozygosity, LOH)两类不同于正常组织DNA的变化。通常认为MSI是由于错配修复系统(Mismatch repair, MMR)功能发生障碍,引起基因组中重复序列次数发生改变,导致肿瘤组织DNA微卫星片段长度发生变化^[12]。LOH机制较为复杂,可能与杂合体丢失、染色体不分离、体细胞重组、染色体缺失、基因突变、表观遗传等系列因素相关^[13]。采用STR遗传标记进行法医DNA鉴定时,MSI表现为与正常组织分型比较,出现A_{new}和A_{add}两种类型,LOH观察到cLOH和pLOH两种类型。由于pLOH不引起STR基因型的改变,因此在法医鉴定过程中难点是对A_{new}、A_{add}和cLOH三种STR_{CA}类型结果的判定。

本研究结果显示在食管鳞癌肿瘤组织中,A_{add}、A_{new}、cLOH和pLOH四种STR变异类型均被观察到,STR_{CA}基因座水平变异率和个体水平变异率分别是1.94%和29%,并且在STR_{CA}类型中,以A_{add}为主,其检出率是78.95%,高于A_{new}和cLOH的检出率($P < 0.05$)。李成涛^[14]采用常染色体STR遗传标记对消化系统肿瘤组织进行身源鉴定研究后,发现STR_{CA}在基因座和个体水平变异率分别是5.25%和32%,其中变异类型以A_{add}为主,在3种STR_{CA}占比约70.24%,与本研究结果基本一致。但钟巧娥等^[15]发现在肺癌组织中STR_{CA}类型以cLOH表现为

主,孙丽娟等^[16]对妇科恶性肿瘤和乳腺癌组织STR_{CA}研究结果类似,以cLOH检出率最高;而李璐等^[17]在甲状腺乳头状癌中发现A_{new}是STR_{CA}的主要类型;马栋棋等^[18]研究发现鼻咽癌组织STR_{CA}类型中,A_{add}和cLOH发生率一样。以上研究结果提示在不同恶性肿瘤组织中,STR_{CA}类型有差异,而A_{add}可能是消化系统肿瘤组织的MSI主要类型。同时发现选取的21个法医DNA鉴定常用的常染色体STR基因座及Amelogenin基因座中有17个发生STR_{CA},其中以FGA、D18S51、D21S11、D12S391和vWA基因座变异率最高。李成涛^[14]在消化系统肿瘤组织中也发现STR_{CA}在基因座水平上分布最多的位点是FGA,其次是D18S51;Vauhkonen等^[19]对原发性胃肠道肿瘤组织的STR变异进行研究,结果显示STR_{CA}检出最多的基因座是D21S11、D18S51、D8S1179以及DS19S433四个基因座;Pelotti等^[20]观察了56例散发性胃肠道肿瘤的STR_{CA}现象,发现D18S51、FGA和vWA基因座变异率最高,提示D18S51、FGA等STR基因座在消化道肿瘤组织的稳定性较差,在用于消化道肿瘤组织作为检材进行个体识别,出现和对照组织分型不一致的结果时,应慎重下结论。

此外,关于STR遗传标记在临床肿瘤医学上应用的研究日益增多^[21-22]。尤其值得关注的是,《NCCN食管和食管胃结合部癌临床实践指南(2023年第3版)》^[23](以下简称《指南》)中明确提出“所有新诊断的食管癌患者,均建议使用PCR/NGS进行MSI检测或IHC进行MMR检测;一旦证实/怀疑为晚期/转移性患者,应进行PD-L1检测”,强调所有患者在病理检测时均应行MSI检测,有利于指导临床系统性治疗甚至预后评估。同时《指南》推荐在“BAT25, BAT26, MONO27, NR21, NR24”等5个微卫星位点对食管肿瘤组织和正常组织进行检测,国内外目前已有相关的商品化试剂盒上市,但还

未见在食管鳞癌患者中的相关数据报道。本研究发
现食管鳞癌肿瘤组织中,STR_{GA}以 MSI 表现为主,仅
发现 1 例 cLOH,并且 MSI 集中在 FGA、D18S51、
D21S11、D12S391 和 vWA 等 5 个 STR 基因座上,表
明以上 5 个 STR 基因座在检测食管癌肿瘤组织 MSI
现象有一定的潜力,可以与《指南》推荐的 5 个微卫
星位点联合使用,获得患者更完整的 MSI 变异
情况。

综上,本研究发现目前法医 DNA 鉴定常用的
17 个 STR 基因座用于食管鳞癌肿瘤组织作为检材
的个体识别时,出现和对照组织分型不一致的结果,
应慎重下结论。同时,可以考虑将 FGA、D18S51、
D21S11、D12S391 和 vWA 等 5 个 STR 基因座作为
研究食管癌肿瘤组织 MSI 现象的标记位点,与《指
南》推荐的 5 个位点联合使用,获取食管癌患者肿
瘤组织更全面的 MSI 结果,指导临床治疗。

参考文献

[1] Butler JM, Coble MD, Vallone PM. STRs vs. SNPs: thoughts on the future of forensic DNA testing[J]. Forensic Science, Medicine, and Pathology, 2007, 3(3): 200 - 205.

[2] Phillips C, Gelabert-Besada M, Fernandez-Formoso L, et al. "New turns from old STaRs": enhancing the capabilities of forensic short tandem repeat analysis [J]. Electrophoresis, 2014, 35 (21-22): 3173 - 3187.

[3] 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.

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

[5] Chen R, Zheng R, Zhang S, et al. Patterns and trends in esophageal cancer incidence and mortality in China; an analysis based on cancer registry data [J]. Journal of the National Cancer Center, 2023, 3(1): 21 - 27.

[6] 郑荣寿, 张思维, 孙可欣, 等. 2016 年中国恶性肿瘤流行情况分析 [J]. 中华肿瘤杂志, 2023, 45(3): 212 - 220.

[7] 王霄, 李博, 包郁, 等. 四川省 105561 例高危人群食管癌筛查结果分析 [J]. 中华肿瘤杂志, 2017, 39(1): 67 - 71.

[8] 侯一平. 法医学物证学 [M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2016.

[9] Lin A, Zhang J, Luo P. Crosstalk between the MSI status and tumor microenvironment in colorectal cancer [J]. Frontiers in Immunology, 2020, 11: 2039.

[10] Kang YJ, O'Haire S, Franchini F, et al. A scoping review and meta-analysis on the prevalence of pan-tumour biomarkers (dMMR, MSI, high TMB) in different solid tumours [J]. Scientific Reports, 2022, 12(1): 20495.

[11] Tong S, Devine WP, Shieh JT. Tumor and constitutional sequencing for neurofibromatosis type 1 [J]. JCO Precision Oncology, 2022, 6: e2100540.

[12] Baretto M, Le DT. DNA mismatch repair in cancer [J]. Pharmacology & Therapeutics, 2018, 189: 45 - 62.

[13] Wijnhoven SW, Kool HJ, van Teijlingen CM, et al. Loss of heterozygosity in somatic cells of the mouse. An important step in cancer initiation? [J]. Mutation Research, 2001, 473(1): 23 - 36.

[14] 李成涛. 消化系统肿瘤组织身源鉴定策略探索 [D]. 上海: 复旦大学, 2010.

[15] 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.

[16] 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.

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

[18] 马栋棋, 杨慧凌, 孟洁敏, 等. 鼻咽癌组织 STR 基因座变异的研究 [J]. 川北医学院学报, 2023, 38(1): 1 - 5.

[19] Vauhkonen H, Hedman M, Vauhkonen M, et al. Evaluation of gastrointestinal cancer tissues as a source of genetic information for forensic investigations by using STRs [J]. Forensic Science International, 2004, 139(2-3): 159 - 167.

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

[21] Aranake-Chrisinger J, Huettner PC, Hagemann AR, et al. Use of short tandem repeat analysis in unusual presentations of trophoblastic tumors and their mimics [J]. Human Pathology, 2016, 52: 92 - 100.

[22] 慕霞. 因多基因遗传疾病发生风险评估而构建的 STR 分析模型及实验基础 [D]. 大连: 大连医科大学, 2021.

[23] Ajani JA, D'Amico TA, Bentrem DJ, et al. Esophageal and esophago-gastric junction cancers, version 2. 2023, NCCN clinical practice guidelines in oncology [J]. Journal of the National Comprehensive Cancer Network, 2023, 21(4): 393 - 422.

(收稿日期: 2024 - 04 - 08

修回日期: 2024 - 05 - 02)