

# 肺癌组织中STR基因座变异规律的研究

马若翔<sup>1</sup>, 李永国<sup>1,2</sup>, 朱英<sup>1,2</sup>, 肖翀<sup>1,2</sup>, 熊进成<sup>1,2</sup>, 胡玉树<sup>1,2</sup>,  
李红卫<sup>3</sup>, 李剑波<sup>1</sup>

1. 重庆医科大学基础医学院法医学教研室, 重庆 400016;
2. 重庆市刑事侦查技术研究中心, 重庆 400016;
3. 重庆市公安局刑警总队技术处, 重庆 400021

**[摘要]** **背景与目的:** 在DNA水平进行个体同一认定及亲缘鉴定, 是目前获得准确结论的最直接的方法, 而短串联重复序列(short tandem repeat, STR)复合扩增荧光检测技术是目前应用最广泛的DNA技术。但已有研究表明STR基因座在肿瘤组织中会发生明显高于正常组织或血液的变异。该研究的目的是探索20个常染色体STR基因座及Amel基因座在人肺癌组织中的变异规律, 为肺癌组织的个人识别及亲缘鉴定提供依据。**方法:** 收集75例人肺癌组织和相对应的癌旁正常组织, 采用组织DNA提取试剂盒提取DNA, Microreader™ 21 Direct ID System试剂盒进行PCR扩增, 采用3130序列分析仪进行毛细管电泳, 用Gene Mapper ID V3.2基因分析软件进行基因分型。**结果:** 75例癌组织中有24例发生了STR位点的变异(32%), 在21个常用STR基因座上共检出55次变异, 其中等位基因增加10次, 杂合性等位基因完全丢失10次, 部分性丢失35次。D2S441、Penta E基因座未检出变异。结合目前实验结果与肺癌患者的临床资料分析, 发现STR位点的变异与肺癌的分型、患者性别无联系( $P>0.05$ ), 与肺癌的分期及患者年龄正相关, 各组间比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。**结论:** 肺癌组织中STR基因座较常发生变异, 并且变异更可能在年龄大、恶性程度高的肺癌中发生; 该实验检出D2S441、Penta E基因座无变异, 在今后的研究中可加大样本量, 进一步验证可否将其纳入稳定的STR基因座, 为肿瘤组织等特殊检材的鉴定提供依据。

**[关键词]** 法医物证学; 肺癌; 短串联重复序列; 基因变异; 基因座

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2017.05.006

中图分类号: R734.2 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2017)05-0353-06

**A study on the tendency of genetic alteration of STR loci in human lung cancer tissues** MA Ruoxiang<sup>1,2</sup>, LI Yongguo<sup>1,2</sup>, ZHU Ying<sup>1,2</sup>, XIAO Xuan<sup>1,2</sup>, XIONG Jincheng<sup>1,2</sup>, HU Yushu<sup>1,2</sup>, LI Hongwei<sup>3</sup>, LI Jianbo<sup>1,2</sup> (1. Department of Forensic Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Chongqing Engineering Research Center for Criminal Investigation Technology, Chongqing 400016, China; 3. Chongqing Public Security Bureau Criminal Investigation Department, Sub-division for Technology, Chongqing 400016, China)

Correspondence to: LI Jianbo E-mail: Ljb2032008@163.com

**[Abstract]** **Background and purpose:** Short tandem repeats (STR) multiplex PCR fluorescence detection technology is the most widely used DNA technology in individual identity and genetic identification. It's the most direct method to obtain accurate conclusions. However, some studies have indicated that the rate of STR mutations in tumor tissue is significantly higher than that in normal tissues or blood. This study aimed to investigate the tendency of genetic instability in 20 STR loci on autosomal and Amel loci in tumor tissue samples from lung cancer. **Methods:** This study, collected 75 cases of human lung cancer tissues and the adjacent normal tissues. DNA samples were extracted by tissue DNA extraction kit, amplified using Microreader™ 21 Direct ID System PCR amplification kit. Capillary electrophoresis was performed using API 3130 analyzer, and results were analyzed by genetic analysis software (Gene Mapper ID V3.2). **Results:** STR alterations were detected in 24 specimens from 75 lung cancer tissues (32%). Fifty-

five alterations were detected in the frequently used 21 STR loci in total, including additional alleles 10 times, loss of heterozygosity 10 times, partial loss of heterozygosity 35 times. Partial loss of heterozygosity was the most common genetic alteration types accounting for 63.64% of the total alteration frequency. And multiple genetic alteration types could occur in the same lung cancer tissue. Among them, the highest alteration frequency occurred on D5S818 (7 times), secondly on D3S1358 and D12S391 (both 5 times), and no alterations on D2S441 and Penta E. Combining the experimental results and analysis on clinical data, this study found the statistical differences between the staging of lung cancer and the age of the patients with the STR loci alterations ( $P < 0.05$ ). However, the alterations did have much relationship with the classification of lung cancer and the patient's gender ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** STR loci of the lung cancer tissue were not stable, and the alteration occurred in the aged or high malignant degree lung cancer tissue more frequently. Meanwhile, no alteration was detected on D2S441 and Penta E. In the future research the two STR loci should be verified to determine whether they can be used as the stable STR loci in such cases by increasing the sample size.

[Key words] Forensic biological evidence; Lung cancer; Short tandem repeats; Genetic alteration; Locus

随着法制社会的建设、发展,司法鉴定逐渐向社会开放服务,个体识别及亲缘鉴定的鉴定案件逐年增加,且待检样本日益多样化,对非正常人体组织(恶性肿瘤组织)进行个体识别的委托明显增多,如在医疗纠纷中对病理取材来源的质疑等。这时对特殊检材的检验、判定提出了更高的要求。而肺癌是发病率最高,对人群健康和生命威胁最大的恶性肿瘤之一<sup>[1-2]</sup>,故本实验选取肺癌作为研究对象,旨在发现其短串联重复序列(short tandem repeat, STR)位点的变异规律,为以后的鉴定工作提供参考。

在DNA水平进行个体同一认定及亲缘鉴定,是目前获得准确结论的最直接的方法。而复合扩增荧光检测技术是目前应用最广泛的DNA技术<sup>[3-4]</sup>。但已有研究表明STR基因座在肿瘤组织中会发生明显高于正常组织或血液的变异<sup>[5-7]</sup>,故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<sup>[8]</sup>。

本实验通过肺癌组织在常用STR基因座的变异率、变异类型检测统计,旨在选出稳定的STR位点,并结合临床资料分析其变异规律。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验样本

取材自四川和重庆的75例肺癌患者手术切除的癌组织和癌旁正常肺组织。其中男性43例,女性32例;中年组(40岁~59岁)31例,老年组(大于等于60岁)44例;腺癌42例,鳞癌33例;

肺癌Ⅰ期37例,Ⅱ期12例,Ⅲ期20例(参照国际肺癌TNM分期系统<sup>[9]</sup>)。所有样本均来自重庆医科大学附属第一医院病理科,于-80℃条件下保存。

### 1.2 DNA提取

剪取适量肺癌组织和正常肺组织,用超纯水清洗后,使用D1000系列高效组织细胞破碎仪(湖北新纵科病毒疾病工程技术有限公司)打碎处理为细胞悬液,离心1 min(11 200×g,  $r=10$  cm),弃上清液。使用组织基因组DNA提取试剂盒(TIANamp Genomic DNA试剂盒),按照说明书操作进行DNA提取。

### 1.3 PCR扩增及分型

使用Microreader™21 Direct ID System人类荧光标记STR复合扩增检验试剂盒(北京阅微基因技术有限公司),按说明书操作,在9700 PCR扩增仪(购自美国ABI公司)上进行扩增,用3130序列分析仪(购自美国ABI公司)进行毛细管电泳;采用Gene Mapper ID V3.2基因分析软件进行基因分型。与相应的癌旁正常组织进行比较,判断等位基因座的变异类型。出现STR分型变异样本再重复检验1次进行确认。

### 1.4 统计学处理

经过上述步骤所得到的结果,结合肺癌分型、分期、肺癌患者的年龄及性别,运用SPSS 18.0统计软件进行chi-square test检验及Cochran-Armitage趋势检验,探讨其关联性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 出现变异的次数统计

75例肺癌组织，通过上述方法检测并与癌旁正常组织检测结果对比，在75例肺癌样本中有24例检出不同于癌旁正常组织的变异(可同时发生多种变异类型)，占肺癌组织样本总数的32%。

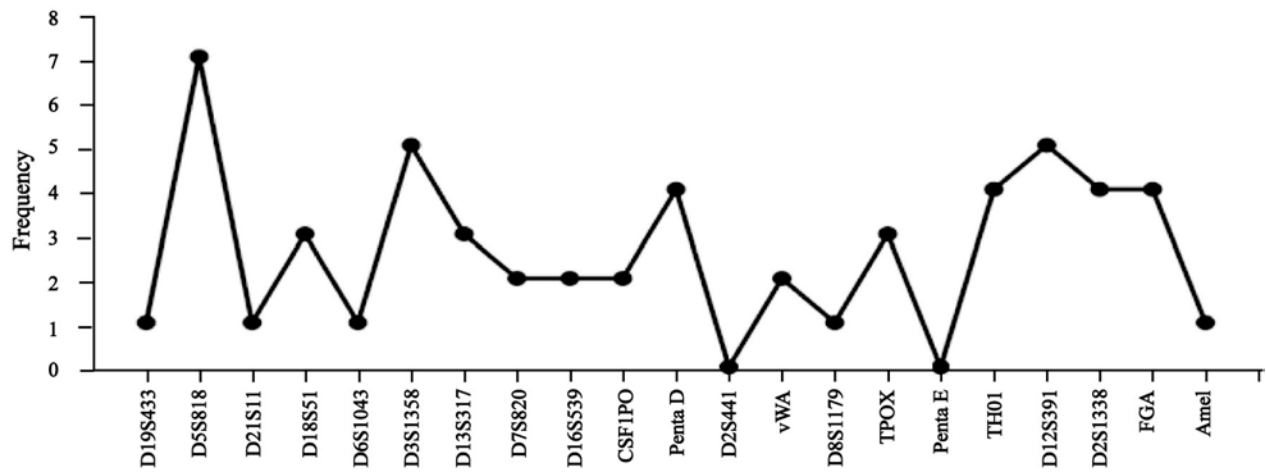


图 1 20个常染色体STR基因座及Amel基因座的变异次数统计

Fig. 1 The mutation statistics of 20 short tandem repeats (STR) loci on autosomal and Amel loci

### 2.2 出现变异的类型统计

在出现等位基因变异的类型中，等位基因增加10次，杂合性等位基因完全丢失10次，部分性丢失35次，等位基因的变更未发生。杂合等位基因部分丢失最常见，占总变异次数的63.64%，并且在同一肺癌组织中多个基因座可同时发生多种变异(表1)。

以下列举3份典型STR变异类型中等位基因分型标准物、癌组织与癌旁正常组织的分型图谱的比较(图2)。

### 2.3 STR变异结合其相关临床资料的分析

#### 2.3.1 STR变异结合肺癌分期

结合目前实验结果与临床肺癌分期，对肺癌Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ期进行 $\chi^2$ 检验及Cochran-Armitage趋势检验。我们发现STR位点的变异与肺癌的分

75例肺癌组织样本在20个常染色体STR基因座及Amel基因座上共发现55次等位基因变异，其中常染色体基因座检出变异54次，Amel基因座检出变异1次。D5S818基因座发生变异最多(7次)，其次为D3S1358、D12S391基因座(5次)，D2S441、Penta E基因座未检出变异。各STR基因座变异数目见图1。

期呈正相关( $P=0.041$ ，表2)。

#### 2.3.2 STR变异结合年龄组

结合目前实验结果与临床肺癌分型，通过 $\chi^2$ 检验及Cochran-Armitage趋势检验我们发现STR位点的变异在老年组中的变异率较高( $P=0.013$ ，表3)。

#### 2.3.3 STR变异结合肺癌类型

结合目前实验结果与临床肺癌分型，通过 $\chi^2$ 检验发现STR位点的变异与肺癌的分型差异无统计学意义( $P=0.437$ ，表4)。

#### 2.3.4 STR变异结合性别

结合目前实验结果与临床肺癌分型，通过 $\chi^2$ 检验我们发现STR位点的变异与肺癌患者的性别关系不显著( $P=0.262$ ，表5)。

表1 75例肺癌组织中等位基因变异次数及变异类型

Tab. 1 Genetic alteration types and quantity statistics of the STR loci from 75 specimens

Loci	Variation types				Total
	Additional alleles	New alleles	Loss of heterozygous	Partial loss of heterozygous	
<i>D19S433</i>	1	0	0	0	1
<i>D5S818</i>	2	0	0	5	7
<i>D21S11</i>	0	0	0	1	1
<i>D18S51</i>	2	0	0	1	3
<i>D6S1043</i>	0	0	0	1	1
<i>D3S1358</i>	0	0	1	4	5
<i>D13S317</i>	0	0	2	1	3
<i>D7S820</i>	1	0	0	1	2
<i>D16S539</i>	0	0	0	2	2
<i>CSF1PO</i>	0	0	0	2	2
<i>Penta D</i>	1	0	1	2	4
<i>D2S441</i>	0	0	0	0	0
<i>vWA</i>	1	0	1	0	2
<i>D8S1179</i>	0	0	0	1	1
<i>TPOX</i>	1	0	0	2	3
<i>Penta E</i>	0	0	0	0	0
<i>TH01</i>	0	0	1	3	4
<i>D12S391</i>	0	0	2	3	5
<i>D2S1338</i>	1	0	1	2	4
<i>FGA</i>	0	0	1	3	4
<i>Amel</i>	0	0	0	1	1
Total	10	0	10	35	55

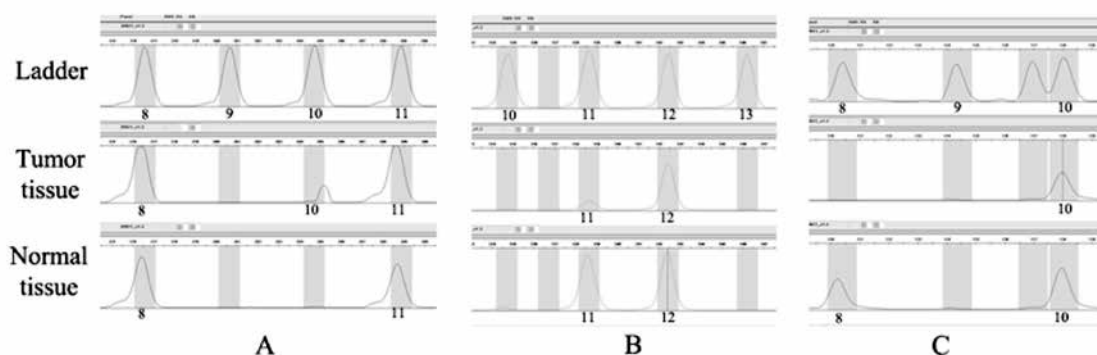


图2 3种典型变异类型

Fig. 2 Three typical types of mutations

In the map, each allele was named after repeated units; A: Additional alleles on TPOX from lung cancer tissues. The “8, 11” allele in normal tissue changed to “8, 10, 11” allele in cancer tissues; B: Partial loss of heterozygous on CSF1PO from lung cancer tissues. Compared with the “11,12” alleles in normal tissue, the peak of “11” alleles in cancer tissues was significantly reduced; C: Loss of heterozygous on TH01 from lung cancer tissues. The “8,10” allele in normal tissue changed to “10” allele in cancer tissues

表2 STR变异与肺癌分期的关系

Tab. 2 The relationship between STR mutations and stages of lung cancer

Group	Non-mutation number	Mutation number	$\chi^2$	P value
Stage I	21	10	6.387	0.041
Stage II	10	2		
Stage III	9	11		

表3 STR变异与患者年龄分组的关系

Tab. 3 The relationship between STR mutations and patient's age groups

Group	Non-mutation number	Mutation number	$\chi^2$	P value
Middle-aged group (40-59 years old)	26	5	6.117	0.013
Elderly group ( $\geq 60$ years old)	25	19		

表4 STR变异与肺癌分型的关系

Tab. 4 The relationship between STR mutations and types of lung cancer

Group	Non-mutation number	Mutation number	$\chi^2$	P value
Adenocarcinoma	27	15	0.605	0.437
Squamous cell carcinoma	24	9		

表5 STR变异与患者性别的关系

Tab. 5 The relationship between STR mutations and gender of patients

Group	Non-mutation number	Mutation number	$\chi^2$	P value
Male	27	16	1.257	0.262
Female	24	8		

### 3 讨 论

STR的结构形式是以相对恒定的短序列作为重复单位,首尾相接,串联连接形成。STR基因座具有高度多态性和其在基因传递过程中遵循孟德尔共显性遗传规律等特点,故广泛应用于个体同一认定及亲缘鉴定。

在法医鉴定工作中常会遇到一些特殊案例,如在医疗纠纷案件中对病理科病理组织的身源鉴定,肿瘤组织成为必要的样本。但国内外研究证明在恶性肿瘤组织中,STR基因座等位基因的变异情况较多见。主要由于DNA复制过程中滑动,或复制和修复时滑动链与互补链碱基错配导致一个或几个重复单位的缺失或插入而产生。据文献报道,其变异类型可分为4类:①等位基因增加(additional alleles);②等位基因变更(new alleles);③杂合性完全丢失(loss of heterozygous);④杂合性部分丢失(partial loss of heterozygous)<sup>[10]</sup>。实际检案中会出现等位基因峰信号的不均衡,通常这种差异不超过30%<sup>[11]</sup>,ISFG推荐的杂合性均衡比为大于等于0.6<sup>[12]</sup>,所以对于杂合性部分丢失判断标准为比值比=正常组织等位基因峰高或峰面积比值/肿瘤组织等位基因峰高或峰面积比值,比值比大于2.0或小于0.5判断为部分杂合性丢失<sup>[13]</sup>。

本实验选取最高发的恶性肿瘤之一的肺癌作为研究对象,旨在为特殊检材的个体识别、亲源鉴定提供参考。收集了取材自川渝片区的75例新鲜人肺癌组织和其对应的癌旁正常组织,检测20个常染色体STR基因座及Amel基因座变

异情况,结合其临床相关资料,旨在研究肺癌组织中STR基因座的变异规律。钟巧娥等<sup>[14]</sup>对取材自内蒙古片区的72例肺癌在19个常染色体STR基因座及Amel基因座的变异分析中,癌组织变异率达41.67%,除TPOX基因座均发生不同程度的变异。本课题实验结果发现肺癌组织中STR基因座等位基因的变异率达32%,并发现了TPOX基因座的变异,对其进一步验证和补充。在21个常用STR基因座上共检出55次变异(常染色体基因座检出变异54次,Amel基因座检出变异1次),其中等位基因增加10次,杂合性等位基因完全丢失10次,部分性丢失35次。杂合性等位基因部分丢失最常见,占总变异次数的63.64%,并且在同一肺癌组织中多个基因座可同时发生多种变异。D5S818位点发生变异最多(7次),其次为D3S1358、D12S391位点(5次),D2S441、Penta E基因座未检出变异。在今后的研究中可加大样本量,进一步验证是否可将D2S441、Penta E基因座纳入稳定的STR位点,为肿瘤组织等特殊检材的鉴定提供依据。相应对于变异率高的位点如D5S818、D3S1358、D12S391位点,应该着重仔细分析。

此外,在近年的研究中提出可将人体组织中STR的变异作为癌症的易感的指标之一<sup>[15]</sup>,结合目前实验结果与临床肺癌分型,我们发现肺癌肿瘤组织的STR变异与肺癌的病理分型、患者性别关系不大,与肺癌的分期及患者年龄差异有统计学意义,说明对于年龄大、恶性程度高的肺癌肿瘤组织更易发生变异,故今后在肺癌组织的鉴定工作中,对于年龄大、恶性程度高的案例应该更加慎重。

综上所述, 肺癌组织中STR基因座较常发生变异, 并且变异更可能在年龄大、恶性程度高的肺癌中发生, 进行STR分型时应慎重判别; 本实验检出D2S441、Penta E位点无变异, 在今后的研究中可加大样本量, 进一步验证可否将其纳入稳定的STR位点, 为肿瘤组织等特殊检材的鉴定提供依据。

#### [参 考 文 献]

- [1] 陈万青, 张思维, 曾红梅, 等. 中国2010年恶性肿瘤发病与死亡 [J]. 中国肿瘤, 2014, 23(1): 1-10.
- [2] SIEGEL R, NAISHADHAM D, JEMAL A. Cancer statistics, 2012 [J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(1): 10-29.
- [3] BUTLER J M. Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing [J]. Biotechniques, 2007, 43(4): 2-5.
- [4] BUTLER J M. Genetics and genomics of core short tandem repeat loci used in human identity testing [J]. J Forensic Sci, 2006, 51(2): 253-265.
- [5] 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]. Hum Pathol, 2014, 45(3): 549-555.
- [6] 刘争, 赵华, 罗志永, 等. 乳腺癌与癌前病变微卫星DNA杂合性缺失研究 [J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(4): 592-595.
- [7] SHILPA V, BHAGAT R, PREMALATA C S, et al. Microsatellite instability, promoter methylation and protein expression of the DNA mismatch repair genes in epithelial ovarian cancer [J]. Genomics, 2014, 104(4): 257-263.
- [8] CECCARDI S, ALU M, LUGARESI F. Evaluation of reliability of STR typing in different types of cancerous tissues used for identification purpose [J]. Int Congress Series, 2006, 1288: 672-675.
- [9] 张用, 毕建平, 皮国良, 等. 国际肺癌研究协会第八版国际肺癌TNM分期修订稿解读 [J]. 肿瘤防治研究, 2016, 43(4): 313-318.
- [10] PAGE K, GRAHAM E A M. Cancer and forensic microsatellites [J]. Forensic Sci Med Pathol, 2008, 4(1): 60-66.
- [11] 侯一平. 法医物证学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 5.
- [12] GILL P, BRENNER C H, BUCKLETON J S, et al. DNA commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on the interpretation of mixtures [J]. Forensic Sci Int, 2006, 160(2): 90-101.
- [13] 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: 15-16.
- [14] 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.
- [15] PRESS M O, CARLSON K D, QUEITSCH C. The overdue promise of short tandem repeat variation for heritability [J]. Trends Genet, 2014, 30(11): 504-512.

(收稿日期: 2016-12-01 修回日期: 2017-02-25)