

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2011.06.002

法医学组织病理切片 STR 分型影响因素的比较分析 *

张 越¹ 陈 阳¹ 杨元立² 李继周² 李朝品^{1△}

(¹ 皖南医学院法医学系,安徽 芜湖 241002;² 公安部物证鉴定中心,北京 100038)

摘 要 目的 研究法医学病理切片 DNA 的基因型,探讨病理切片的组织类型、保存时间与尸源年龄对 STR 分型的影响。方法 运用 16 位点 Loci-STRs 复合荧光标记 STR-PCR 技术,采用 7 阶重复拉丁方实验设计,取 14 例尸检 7 个年龄段的新鲜组织样本,制作脑、心、肝、肾、脾、肺、肠等 7 类组织病理切片,将切片随机分组保存 7d、14d、30d、90d、180d、360d、720d。用硅珠法提取切片 DNA,采用 AmpFISTR® Identifiler™ 16STR 系统进行 STR 分型。以新鲜尸体 DNA 样本的基因型为阳性对照,比较分析组织切片 DNA 的 STR 基因座检出数。结果 尸源年龄组之间 STR 基因座检出率的差异不显著($P=0.19$)。保存时间分组中,保存 30d 以内,STR 检出数无显著差异($P=0.73$),均可准确检出 12 个以上基因座;保存 30d 以上,STR 基因座检出数与保存时间成负相关;保存 360d 以上,等位基因脱扣(ADO)与基因座缺失(LOH)显著增高,STR 分型不准确。同一保存时间,组织类型之间 STR 基因座检出率存在显著差异($P<0.01$),其中肺组织相对较高。结论 组织切片的保存时间是影响 STR 分型的主要因素,随着保存时间延长,其 STR 分型成功率下降;肺组织切片是 STR 分型较为理想的样本。

关键词 法医学;组织病理切片;STR 分型

中图分类号:R89 文献标志码:A 文章编号:1000-9760(2011)12-385-05

Comparative analysis of influential factors for STR genotyping in forensic pathological sections

ZHANG Yue, LI Chao-pin, CHEN Yang, et al

(Department of Forensic Science, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China)

Abstract: Objective To explore the effects of tissue types, length of pathological sections preserved and death ages on STR genotyping through fluorescent 16 loci multi-STR-PCR detection. **Methods** Pathological sections were prepared from the brain, heart, liver, lung, spleen, kidney and ileum tissue obtained in 14 cases of fresh autopsy by 7 death ages, and preserved for 7, 14, 30, 90, 180, 360 and 720 days, respectively, in terms of Latin square by double 7-order design. The DNA templates were extracted by silicon bead method, and DNA samples of section were genotyped with AmpFISTR® Identifiler™ system in ABI 310 Genetic Analyzer. Additional DNA was extracted from the fresh autopsies as positive controls. **Results** Death age group showed no significant difference in detection of STR loci ($P>0.05$). No difference was found in the sections preserved for 30 days concerning STR loci ($P>0.05$), though 12 loci were detected on STR that was negatively correlated with the profiling success number and length of storage. Allele dropout (ADO) and loss of heterozygosity (LOH) occurred more frequently in the sections maintained beyond 360 days, which commonly led to faint STR genotyping. Yet, different tissues maintained in the same length revealed significant difference with the accurately detected STR loci, which remained the highest in the lung section ($P<0.01$). **Conclusion** The length of sections saved tends to affect the STR genotyping and accurate detection of it in pathological sections with time extension. Apart from that, pulmonary tissue section appears to be favorable samples for STR genotyping in individual DNA identification.

Key words: Forensic genetics; Pathological section; STR genotyping

* [基金项目] 安徽省高校青年教师科研资助计划项目(编号:2007jq1176); 安徽省自然科学基金项目(编号:070413088); 国家自然科学基金资助项目(编号:C080804)。

△ [通信作者] 李朝品, E-mail: cpli001@126.com

近年来,组织病理学与细胞形态学研究的组织切片,越来越多地出现在法医学 DNA 实验室,成为一种重要的 DNA 物证^[1]。如因调错病理切片而误诊所致的医疗纠纷案件、利用他人病变组织进行医疗保险欺诈案件以及部分特殊的亲子鉴定与刑事案件,需要对组织切片 DNA 进行同一性认定,确定组织切片的真实身源,以提供个体识别的法庭证据。由于组织切片细胞含量少,甲醛固定与染色等流程对 DNA 的化学与机械损坏,且切片中存在 PCR 扩增抑制物,造成了其 STR 分型结果不确定性^[2]。本文从保存时间、组织类型以及尸源年龄等 3 个方面,探讨病理切片 STR 分型的影响因素。

1 材料与方法

1.1 实验样本与分组设计

本实验将组织切片保存时间、组织类型、尸源年龄 3 个因素各分为 7 个水平(表 1),因各因素间无交互作用且水平数相同,故采用重复 7 阶拉丁方设计,将 98 例组织切片编码后随机分组。

取本鉴定中心尸检中 14 例 7 个不同年龄段的脑、心、肝、肾、脾、肺、肠等 7 类新鲜的组织样本,在 10% 甲醛固定 2d 后,按标准程序取样制备成石蜡包埋组织、制作常规 HE 染色的组织切片,切片厚度为 5 μ m,室温下分别保存 7d、14d、30d、90d、180d、360d、720d。

表 1 组织切片 STR 分型实验的 3 因素 7 个水平
重复拉丁方设计

处理因素	水平 I	水平 II	水平 III	水平 IV	水平 V	水平 VI	水平 VII
组织类型	脑	心	肝	肺	脾	肾	肠
保存时间	7d	14d	30d	90d	180d	360d	720d
尸源年龄	婴儿(0~3 周岁)	幼儿(4 月~3 岁)	少儿(3~6 岁)	少年(7~17 岁)	青年(18~35 岁)	中年(36~60 岁)	老年(60 岁以上)

1.2 主要试剂与仪器

Leica RM2126 型切片机(Leica, Germany); AmpFISTR[®] Identifiler[™] 试剂盒、GeneAmp[®] PCR system 9700 型扩增仪、ABI PRISM[™] 310 遗传分析仪(ABI, USA)。

1.3 样本切片预处理与 DNA 模板提取

1.3.1 样本切片预处理 组织切片经二甲苯脱蜡 3~5 min $\times$ 2,无水乙醇洗 3~5 min $\times$ 2,待切片自然干燥,用无菌手术刀片将组织刮入 1.5ml 离心管中,用去离子纯净水洗涤,离心弃上清备用。

1.3.2 硅珠法 DNA 模板提取 离心管加入 70 μ l TNE、10 μ l 10% SDS 及 10 μ l PK(2mg/ml),振荡混

匀后 56 $^{\circ}$ C 保温 30min, 99 $^{\circ}$ C 加热 12min。继加入 150 μ l 裂解液(硫氰酸胍),振荡混匀 5s, 12000 $\times$ g 离心 2min,移上清至另一管,再加入 10 μ l 硅珠悬液,振荡混匀 5s,室温放置 15min,振荡混匀 5s, 8000 $\times$ g 离心 10s。弃上清,用 150 μ l 冷 70% 乙醇洗涤 2 次, 60 $^{\circ}$ C 烘干 2min。加入 100 μ l TE (10mmol/L Tris-HCl, 1mmol/L EDTA, pH8.0),振荡混匀 5s, 56 $^{\circ}$ C 保温 20min, 12000 $\times$ g 离心 2min,制备成 DNA 模板, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.4 STR 基因座分型

1.4.1 STR 基因座荧光扩增 采用 ABI Identifiler 试剂盒对 16 个 STR 基因座进行分型, 10 μ l Multi STR Loci-PCR 体系: PCR Reaction Mix 3.82 μ l、Primer Set 2.0 μ l、Ampli Taq Gold DNA 聚合酶 0.18 μ l、模板 DNA 4.0 μ l。PCR 反应的热循环条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 11min、94 $^{\circ}$ C 变性 1min、59 $^{\circ}$ C 退火 1min、72 $^{\circ}$ C 延伸 1min,共 28 个循环,最后 60 $^{\circ}$ C 延伸 60min。

1.4.2 STR 分型检测 取 Hi-Di 甲酰胺 10.0 μ l、分子量内标 GS-500 LIZ 0.2 μ l、PCR 产物 1.5 μ l,振荡混匀后进行毛细管电泳,进样时间设为 10s。电泳结果使用 Gene Mapper ID v3.1 软件分析,检测 STR-PCR 产物片段的等位基因与基因型。

1.5 统计学分析

应用 SPSS12.0 统计软件进行统计学分析,分组间样本数据的比较运用 ANOVA 分析。

2 结果

2.1 STR 检测分型结果

以新鲜尸体的 STR 基因型为阳性对照,比对组织切片 DNA 样本的 STR 分型结果,见表 2。

表 2 组织切片 DNA 样本 STR 基因座等位基因 Allele 的准确检出数与检出率

组织类型	保存时间(d)							检出合计	检出率
	7	14	30	90	180	360	720		
脑	49	50	46	34	30	10	3	222	0.569 ^b
心	56	55	49	34	27	19	3	243	0.623 ^a
肝	57	53	53	38	37	11	5	254	0.651 ^a
肺	53	56	58	46	43	31	13	300	0.769 ^c
脾	53	51	56	46	35	20	5	266	0.682 ^a
肾	52	54	52	37	34	20	9	258	0.662 ^a
肠	48	45	46	31	16	9	2	197	0.505 ^b
检出合计	368	364	360	266	222	120	40	1740	\
检出率	0.944 ^A	0.933 ^A	0.923 ^A	0.682 ^B	0.569 ^C	0.308 ^D	0.103 ^E	\	0.6374

注: 1) 98 例组织切片 DNA 样本的等位基因合计为 2730 个。
2) 两两比较采用 χ^2 检验, 两组间字母相同表示 $P > 0.05$, 字母不同表示 $P < 0.01$, 大写字母代表保存时间分组的比较结果, 小写字母代表组织类型分组的比较结果。

切片的组织类型组、保存时间组、尸源年龄组的 STR 等位基因检出数与基因型检出数的比较见表 3,尸源年龄组之间差异无统计学意义($P>0.05$),组织类型之间、保存时间之间具有显著差异($P<0.01$)。

2.2 STR 分型结果与保存时间之间关系

STR 基因座检出数与保存时间成负相关,随着保存时间延长,组织样本的 STR 基因座检出数渐下降(见图 1)。保存时间大于 90d,仅肺、脾两种切片可检出 10 个以上 STR 基因座;保存 180d 的肠、脑切片的 STR 检出数仅为 6~7 个。

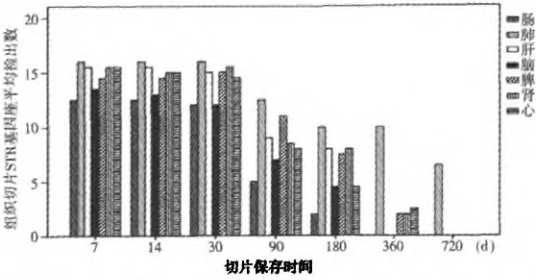


图 1 组织切片的 16 位点 Loci-STRs 基因型检出数

表 3 组织切片 DNA 样本 STR 等位基因与基因型的检出数 ANOVA 分析

变异来源	DF	SS		MS		F		Sig	
		Allele	Genotype	Allele	Genotype	Allele	Genotype	Allele	Genotype
总变异	98	38871	11048	428.92	178.811	116	79.9	—	—
组织类型组	6	457.84	317.244	76.306	52.874	20.64	23.626	0	0
保存时间组	6	7202.6	2897.96	1200.4	482.993	324.6	215.822	0	0
尸源年龄组	6	60.122	3.388	10.02	0.565	2.71	0.252	0.19	0.957
误差	79	292.11	176.796	3.7	2.238				

STR 位点检出率的两两比较见表 2。7d、14d、30d 3 个保存时间分组间的基因型检出数无显著性差异($P>0.05$),等位基因检出数亦无显著性差异($P>0.05$)。保存时间大于 90d,各切片均有 STR 基因型未检出,STR 基因型检出数小于 10;保存时间大于 360d,组织切片大部分 STR 基因座均未检出。

2.3 STR 分型结果与组织类型之间关系

如图 1 所示,保存时间小于 30d 的各组织类型切片,均可准确检出 12 个以上 STR 基因型。表 2 示组织类型分组的两两之间 STR 位点检出率,肠、脑 2 组之间无显著性差异($P>0.05$),肾、脾、心、肝 4 组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。肺组织的 Allele 与 Genotype 检出率最高,肠、脑组织较低。

2.4 STR 分型结果中 ADO 与杂峰现象

以同一尸源个体的 STR 分型阳性对照,图 2 显示保存 360d 脾切片 STR 的 ADO 与杂峰现象,以及偏性扩增(PA)与随机扩增(SA)效应。

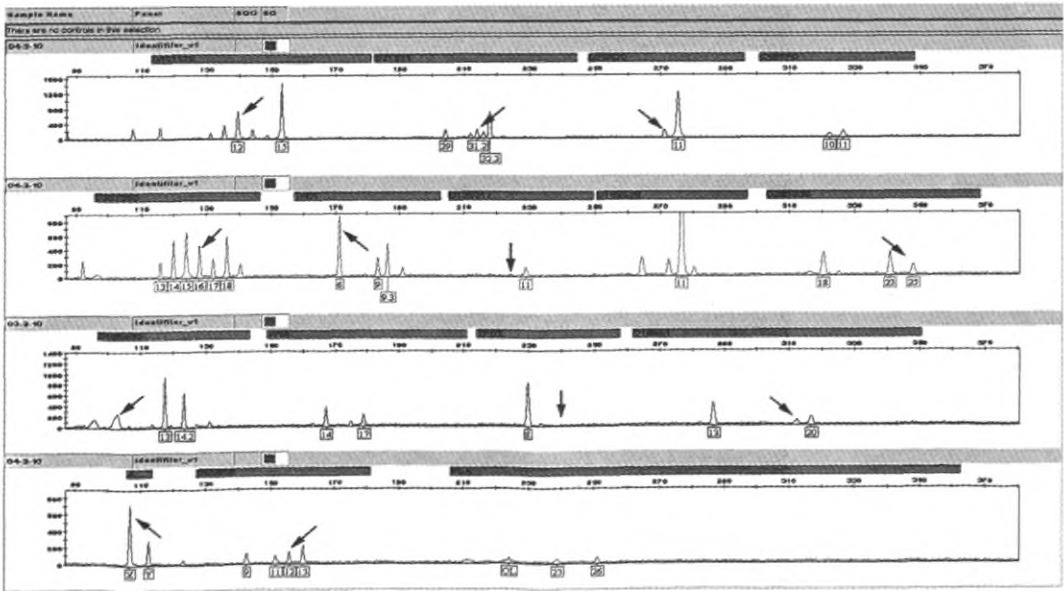


图 2 保存时间 360d 脾组织切片的 STR 分型中 ADO、Stutter 峰、SA 峰、PA 峰

3 讨论

组织病理切片应用于个体识别与身源认定的研究,是当前法医学低拷贝模板(low copy number, LCN)^[3] DNA 分型领域的热点。国内外研究显示,等位基因脱扣(allele drop out, ADO)^[4]与杂合基因座丢失(Loss of heterozygosity, LOH)^[5]是 LCN-STR 分型错误的重要原因。在 STR 分型中,可识读峰的 STR 峰高应大于 150RFU(相对荧光单位)。杂合子基因座等位基因的峰高比(PHR)大于 0.5,视为等位基因均衡扩增;PHR $\leq$ 0.5,视为偏性扩增(preferential amplification, PA)。若杂合子的一个等位基因峰低于 150RFU,且 PHR $\leq$ 0.2,称为 ADO;若两个等位基因峰均低于 150RFU,称为 LOH。ADO 或 LOH 易出现在下述两种微量 DNA 分型中:1)DNA 模板浓度低于 PCR 体系有效阈值,2)DNA 模板溶液中存在扩增抑制物,影响 PCR 扩增效果^[6]。此外,单细胞基因分析极易发生 ADO,且等位基因片段越长,ADO 发生率即越高。本实验亦显示,由于部分结肠、脑组织等切片 DNA 模板浓度偏低,出现不同程度的 ADO 与 LOH,影响 STR 分型结果。

在法医学个体识别 STR 分型中,检出大于 12 个 STR 基因座,其累计个体识别率(TDP)即可达到同一性分析的统计学要求。本实验显示,保存 1 个月以内的各种组织类型切片,均可准确检出 12 个以上 STR 基因型。保存 3 个月以上,由于切片细胞含量进一步减少、基因组拷贝逐步降低,同时抑制物对 PCR 扩增影响度相对加大^[7],出现 STR 短片段 PA,且杂合子长片段出现 ADO 现象,可准确识读的 STR 基因型有所减少。保存大于半年,STR 基因座 PA、ADO 较为普遍,且保存时间越长、杂峰越多,并出现 LOH,获得 STR 基因型数量多低于 10 个。保存 1a 时,由于随机扩增(stochastic amplification, SA)效应,出现大量 pull-up、stutter peak、off-ladder 等异常杂峰,仅部分组织样本可检出 4~5 个 STR 基因型。保存大于 2a,切片基因组含量极低,LOH 较为普遍,已无法进行 STR 分型。本研究提示,组织切片的保存时间是 STR 分型至关重要的影响因素,长期保存的组织切片,应充分考虑到 LCN 模板的 SA 与 PA,应慎重对待 STR 基因分型结果。

本研究中,保存 1 个月以内的各种组织切片均可以检出 12 个 STR 位点,显示此期间的组织类型对 STR 检出率没有影响。各种组织类型切片随着

保存时间延长, DNA 逐步降解^[8],其分型成功率逐渐下降。保存时间在 3 个月到 1a 之间的切片,ADO 是导致 STR 错误分型的主要因素,组织类型之间 ADO 发生率无显著性差异,提示此期间的组织类型对 ADO 不产生影响。保存大于 1a 的组织切片,STR 分型错误的主要原因是 LOH。组织类型比较显示,在同一保存时间内,肠组织 STR 分型成功率最低,肺组织检出率较高,同 Rivero 等研究结果相一致^[9]。相对于其他组织,由于肺组织特点,其固定时浸入甲醛相对较少,可以部分耐受甲醛固定、石蜡包埋、组织染色等过程对 DNA 的破坏^[1]。本研究提示,肺组织切片 DNA 模板质量相对较高,因而具有较高的 STR 基因座检出率。运用病理切片进行身源鉴定时,肺组织应作为 STR 分型的首选。

本研究表明,组织切片的保存时间与组织类型均影响 STR 基因座分型,个体年龄或尸源年龄对切片 STR 分型影响不大。切片保存时间决定其 DNA 模板质量,是 STR 分型成功与否的关键因素。运用组织切片进行个体识别与身源认定时,需把握好切片样本的 DNA 提取时机,并选择 DNA 质量相对较高的组织。本研究证实,保存 3 个月以内的切片可以准确进行身源认定。本课题组将运用全基因组扩增技术(whole genome amplification, WGA)^[10-11],进一步探讨保存时间大于 6 个月组织切片的 STR 分型。

参考文献:

- [1] 柳燕,李莉,赵珍敏,等. 甲醛固定石蜡包埋组织 STR 分型检测[J]. 法医学杂志, 2009, (25)5:337-344.
- [2] Banaschak S, Rolf B, Brinkmann B. Influence of different staining techniques on the DNA analysis of histological sections[J]. Int J Legal Med, 2000, 113:114-116.
- [3] Budowle B, Eisenberg AJ, van Daal A. Validity of low copy number typing and applications to forensic science[J]. Croat Med J, 2009, 50(3):207-217.
- [4] Marielle H, Miriam M, Steven R, et al. Allelic drop-out in the STR system ACTBP2(SE33) as a result of mutations in the primer binding region[J]. Int J Legal Med, 2004, 118:361-363.
- [5] Paola MVR, Marcus H, Francesco B, et al. An integrated Bayesian analysis of LOH and copy number data[J]. BMC Bioinformatics, 2010, 11:321.
- [6] Sato Y, Sugie R, Tsuchiya B, et al. Comparison of the DNA extraction methods for polymerase chain reaction amplification from formalin-fixed and paraffin embedded tissues[J]. Diagn Mol Pathol, 2001, 10(4):256-271.

(下转第 422 页)

2 讨论

皮肤转移性肿瘤是恶性肿瘤通过组织间隙、血管或淋巴管扩散皮肤组织的继发性病变;偶可手术中种植。淋巴瘤、白血病可累及皮肤,不视为转移。恶性肿瘤的皮肤转移较其他脏器转移少见^[1], Spancer 等在一组 7518 例患者尸检材料中发现有 769 例(11%)有皮肤转移。在女性患者中,来源于乳腺肿瘤的占 69%,以下依次是结直肠肿瘤(9%),恶性黑素瘤(5%),卵巢癌(4%);在男性患者中,肺癌(24%)占第 1 位,以下依次为结直肠肿瘤(19%),黑素瘤(13%),口腔鳞状细胞癌(12%)。本组资料男性肺癌占第 1 位,女性乳腺癌占第 1 位,与文献报道相符^[2]。在肿瘤患者病程中出现多发无痛皮内结节、肿块,诊断不难,当皮肤转移性肿瘤为首发症状时,尤其炎性表现及孤立性结节患者易误诊为其他疾病。恶性肿瘤的皮肤转移的途径可能是癌细胞脱落后进入血液循环形成微小癌栓,在皮肤小血管内滞留,而此时病人免疫功能低下,免疫活性细胞难以清除血液循环中微小癌栓,致使其不断生长而形成真皮内的无痛性结节病灶。故皮肤转移性肿瘤易发生于与原发癌靠近的部位,为胸部、腹部、肩背部,头颈部和四肢等处少见,部分病例可发生在以往恶性肿瘤切除的手术瘢痕区。

皮肤转移性肿瘤组织学上与原发肿瘤相似,但比原发肿瘤的分化更差,组织学类型依次为腺癌、鳞癌、未分化癌^[3]。Hu 等研究发现,腺癌较其他组织病理类型更易发生皮肤转移,不同的内脏恶性肿瘤,皮肤转移发生率不同,转移到皮肤上的部位

也不同,这与参与皮肤转移所累及的因子的转移能力有很密切的关系,而非趋化因子受体 CCR10 和 CXCR4 所致。

转移癌的临床可表现为结节肿块型、炎性及硬皮型。一般前者多见,表现为无痛性肿块或结节,多为多发性,可在短期内增大后相对保持静止。病变区皮肤可伴有颜色改变及溃疡形成,质地中等或较硬,活动性差。一些皮肤转移性肿瘤可作为内脏恶性肿瘤的首发表现,在一定程度上能帮助医生早期发现原发肿瘤。如果发现皮肤出现经久不愈性溃疡、顽固硬化性红斑、原因不明的皮肤结节等情况时,应及早进行病理活检以明确诊断,以免延误病情。

恶性肿瘤一旦发生皮肤转移,常合并其他多脏器转移,预后较差。Schoenlaub 等研究 228 例有皮肤转移的肿瘤患者,皮肤转移后中位生存时间是 6.5 个月,其中肺癌为 2.9 个月。患者的生存时间除与肿瘤进展程度有关外,尚与原发部位有关。原发于肺、食道、肝、胰腺等部位肿瘤患者的生存时间要明显短于原发于乳腺、肾脏及恶性黑素瘤者。肺癌发生皮肤转移的中位生存时间最短,预后最差。

参考文献:

- [1] 张春敏,孟双荣,齐元富,等.皮肤转移癌 16 例临床及组织学分析[J].中国麻风皮肤病杂志,2010,26(6):407-408.
- [2] 孔令城,张宜玲,赵保华,等.104 例皮肤转移性肿瘤的临床病理分析[J].诊断病理学杂志,1995,2(4):211-213.
- [3] 甘小艳,黄程辉,文海泉,等.发生皮肤转移的恶性肿瘤 78 例临床分析[J].临床皮肤科杂志,2009,38(8):506-507.

(收稿日期 2011-11-15)

(上接第 388 页)

- [7] Legrand B, Mazaneourt P, Dufigon M, et al. DNA genotyping of unbuffered formalin fixed paraffin embedded tissues[J]. Forensic Sci Int, 2002, 125(2-3):205-211.
- [8] Cornelis JJH, Jan Damen, Johannes CL, et al. Comparative analysis of four methods to extract DNA from paraffin-embedded tissues; effect on downstream molecular applications [J]. BMC Research Notes, 2010, 3:239.
- [9] Rivero ER, Neves AC, Silva VM, et al. Simple salting-out method for DNA extraction from for malin-fixed, paraffin-embedded tissues[J]. Pathol Res Pract, 2006, 202(7):523-529.
- [10] Ballantyne KN, Oorschot RA, John MR, et al. Increasing amplification success of forensic DNA samples using multiple displacement amplification[J]. Forensic Science Medicine and Pathology, 2007, 3(3), 182-187.
- [11] Alsmadi O, Alkayal F, Monie D, et al. Specific and complete human genome amplification with improved yield achieved by phi29 DNA polymerase and a novel primer at elevated temperature[J]. BMC Research Notes, 2009, 2:48-55.

(收稿日期 2011-11-20)