

实时荧光定量 PCR 微卫星分析技术检测少突胶质细胞肿瘤染色体 1p、19q 和 10q 杂合性缺失

苏江^{1,2}, 江涛^{3a}, 孙振荣^{3b}, 李桂林^{1a}, 袁芳^{1b}

[摘要] 目的 建立检测脑胶质瘤染色体 1p、19q 和 10q 杂合性缺失(LOH)的实验室新方法。方法 采用 Taqman 探针法对 38 例少突胶质细胞肿瘤标本进行染色体 1p、19q 和 10q LOH 检测。结果 38 例少突胶质细胞肿瘤染色体中有 25 例(65.7%)发生 1p LOH, 26 例(68.4%)发生 19q LOH, 5 例(13.2%)发生 10q LOH。结论 实时荧光定量 PCR 微卫星分析技术快速、准确性高,可以用于脑胶质瘤标本染色体 LOH 的检测。

[关键词] 少突胶质细胞瘤;杂合性缺失;聚合酶链反应

Loss of Heterozygosity in Oligodendroglioma by Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction-based Microsatellite Analysis SU Jiang, JIANG Tao, SUN Zhen-rong, et al. Beijing Neurosurgical Institute, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100050, China

Abstract: **Objective** To set up the new lab examination method for 1p, 19q and 10q loss of heterozygosity(LOH) in glioma. **Methods** Thirty-eight cases of oligodendroglioma were enrolled into the study. Real-time quantitative polymerase chain reaction-based microsatellite analysis was performed on tumor tissues in order to study the status of chromosomes 1p, 19q and 10q. **Results** Among the 38 cases of oligodendroglioma, 25 cases (65.7%) showed 1p LOH, 26 cases (68.4%) showed 19q LOH, while 5 cases (13.2%) showed 10q LOH. **Conclusion** Real-time quantitative polymerase chain reaction-based microsatellite analysis is a rapid and specific for detecting LOH in glioma tissues.

Key words: oligodendroglioma; loss of heterozygosity; polymerase chain reaction

[中图分类号] R73;R44 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1006-9771(2011)02-0141-04

[本文著录格式] 苏江,江涛,孙振荣,等.实时荧光定量 PCR 微卫星分析技术检测少突胶质细胞肿瘤染色体 1p、19q 和 10q 杂合性缺失[J].中国康复理论与实践,2011,17(2):141—144.

脑胶质瘤是一种最常见的颅内肿瘤,约占脑肿瘤半数以上,多成浸润性生长,手术不易全切,治疗效果差。而少突胶质细胞肿瘤是其中较为特殊的一类肿瘤,约占胶质瘤的 5%~18%^[1],放化疗敏感性较高,且预后相对较好。研究表明染色体 1p/19q 杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH)是少突胶质细胞肿瘤相对特异的分子遗传学改变^[2],与少突胶质细胞肿瘤化疗的敏感性和化疗后较长的生存期密切相关^[3]。同时,约 14%~58%的间变性少突胶质细胞瘤存在 10 号染色体的缺失,且与 1p/19q 缺失负相关^[4-5],是少突胶质细胞瘤进展标志^[6]。而且伴有 1p LOH 的星形细胞瘤和胶质母细胞瘤也具有较好的预后^[7-8]。这说明检测染色体 1p、19q 和 10q LOH 在脑胶质瘤的诊断、指导临床治疗和判断预后方面有着重要的意义。

根据实时荧光定量 PCR 微卫星分析(Quantitative Microsatellite Analysis, QuMA)技术的基本原理,本研究建立一种经过改良的高通量、操作简便、适合实验室推广的新的检测方法,并对 38 例少突胶质细胞肿瘤标本进行染色体 1p、19q 和 10q LOH 检测。

1 材料和方法

1.1 材料 收集首都医科大学附属北京天坛医院 2006~2009 年经神经外科开颅术切除获取的少突胶质细胞肿瘤标本 38 例(男 23 例,女 15 例),全部病例均依据 WHO 2007 年神经系统肿瘤分类标准重新诊断、分级。其中,少突胶质细胞瘤(O, WHO II 级)15 例,间变型少突胶质细胞瘤(AO, WHO III 级)9 例,少突星形细胞瘤(OA, WHO II 级)14 例;另外选取癫痫组织 8 例作为正常脑组织 DNA 来源。

1.2 标本组织 DNA 提取 所有组织标本经北京市神经外科研究所神经病理科确认并分类,肿瘤组织在显微镜下行手工显微切割,去除正常组织。用 TransGen 组织 DNA 提取试剂盒(北京全式金公司)分别提取少突胶质细胞瘤和正常脑组织 DNA。提取的 DNA 用分光光度计(BECKMAN DU640)测定其浓度、纯度, -20℃ 保存备用。

1.3 引物和探针 选取 1 号染色体整条短臂为检测范围区间(1p13.3~p36.3),远端(D1S450, D1S2783),

基金项目:1.北京市自然科学基金资助项目(7102028);2.北京市卫生系统高层次卫生技术人员培养计划(2009-3-23)。

作者单位:1.北京市神经外科研究所,a.神经病理室;b.病理生理室,北京市 100050;2.首都医科大学,北京市 100069;3.首都医科大学附属北京天坛医院,a.脑胶质瘤治疗中心;b.神经外科,北京市 100050。
作者简介:苏江(1983-),男,山西临汾人,硕士研究生,主要研究方向:脑胶质瘤的分子生物学研究。通讯作者:袁芳(1963-),女,北京市人,医学博士,博士生导师,主要研究方向:神经外科基础研究。

中段(D1S2737),近端(D1S252,D1S453)共 5 个微卫星位点;10 号染色体长臂检测区域是 D10S1690 和 D10S555 两个微卫星位点;19 号染色体长臂检测区域是 D19S900 和 D19S926 两个微卫星位点。严格按照实时荧光定量 PCR(Quantitative Polymerase Chain Reaction, QPCR)引物设计原则,从 Genbank(www.ncbi.com)中查找微卫星位点引物,根据 Oligo 6 软件

进行筛选;选取位点的引物序列见表 1。参照 Nigro 等^[9]方法设计,本实验选择 6 组引物作为参照,其所在染色体在胶质瘤发生发展中被证明是相对稳定的^[2,10-11],序列详细情况见表 1。Taqman 探针序列:5'-Fam-TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT-Tamra-3',25bp。引物和探针由美国 Invitrogen(上海)英骏生物技术有限公司合成。

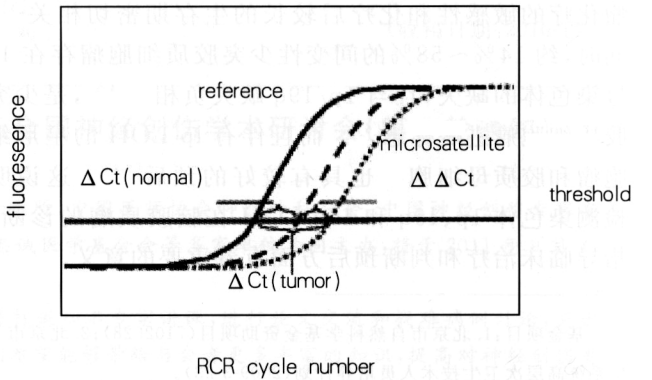
表 1 PCR 使用的引物

	位置	上游引物序列	下游引物序列
检测位点			
D1S450	1p36.2	CAATGCTGATCTCTTCTGG	ACTGGGCTAAGGGTACTCAG
D1S2783	1p35.1-p34.3	CCCTACCCTAATTCCTACTG	GTTTATGTTTCACCTCCTATCC
D1S2737	1p31	TCTGGAGCCCTAAGCAAG	GCCAGGCACTGTTCTAAGAT
D1S252	1p13	AGCTTTTTACTCTTAACCTATTTCAT	GCAGAGAACATGTGTATTAATGA
D1S453	1p12	TCGTCTAGGCTACAACATTCA	TACTTGTGGAGTGAAGGAAGTC
D10S1690	10q23.3	CATTCTGCCATGATGACA	TGCTCCCAGGTGACAAAGA
D10S555	10qter	CTGGATATGGAATGGAGTATCA	TTCTCTTCTCCCTCATTTCTG
D19S900	19q13.2	CCTAATAATCAGTCACTGTCTGG	TTACATGATGCTGGGAACAC
D19S926	19q13.42	TCTGGTGAGAATTCCTAAGTAGTTC	GGCCTTATGCGTGAGTAGTT
内参位点			
D2S350	2q32	TACTTGGGTTTTTGGCATAG	AAATGTTCCAAGCAACTCCT
D3S3624	3p22.2-p21.32	GGGATATGACTGCCCAAC	GCCTCAAAATGCGAATG
D5S490	5q23	GCAAACCTGCACTATCCTTTC	AAAGTGAGGAGTCAAGGAGG
D8S1800	8q21.2	CCATCAAATGTGCAACACTG	GTCCACCAATGCGTTAAAG
D12S309	12q22	AGCTCATTCGCACATGG	TCCTATCTTGGATCAGGTTG
D21S415	21q11	CCTGATTTGTCTTTCATCTCG	TGCCTGCTGTTGGACTTACT

1.4 实时荧光定量 PCR 技术(Taqman 探针法) 使用 LightCycler 480 实时荧光定量 PCR 反应仪(美国 ROCHE 公司)进行扩增反应。在 96 孔板(ROCHE)上各反应管均采用 20 μl 反应体系,含 20 ng DNA,10 μl HotStart-IT Probe qPCR Master Mix (2×)(美国 USB 公司),0.3 μmol/L 上游及下游引物和 200 nmol/L 探针。PCR 反应条件是:95℃ 预变性 2 min,进入循环后按 95℃ 15 s,59℃ 退火 18 s,72℃ 延伸 180 s 的程序,扩增 40 个循环。为了使加入的 DNA 模板标准化,在每个反应板中各加入一组标准参照引物,进行多重扩增作为对比参照。对照反应管内每对参照引物的终浓度为 0.6 μmol/L。为减小孔间及标本间由于操作等原因造成的误差,每个标本每个检测位点及内参引物群均平行做 3 个孔,以三者平均值来统计结果。

1.5 结果判定标准 每个检测位点的 ΔCt 为检测位点的 Ct 值与内参引物群 Ct 值的差值,即: $\Delta Ct = Ct_{\text{检测位点}} - Ct_{\text{内参}}$ (如图 1)。肿瘤标本的 DNA 数量与正常组织中 DNA 数量的比值= $2^{-\Delta\Delta Ct}$,其中 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{肿瘤}} - \Delta Ct_{\text{正常组织}}$;若设正常组织的 DNA 数量为 2,则肿瘤标本的 DNA 数量= $2 \times (2^{-\Delta\Delta Ct})$ 。对 8 个正常脑组织的 ΔCt 进行统计分析,得出每个检测位点的平

均值与标准差,从而可得出正常组织该位点的 95%置信区间(表 2)。为进一步减少各微卫星位点引物在同一条条件下因不同扩增效率而引起的误差,每一个待检测微卫星位点及参照位点的 Ct 值分别计算。



实线为内参引物 QPCR 扩增曲线,短虚线为肿瘤 DNA 检测位点引物扩增曲线,长虚线为正常组织 DNA 检测位点引物扩增曲线

图 1 QuMa 比较肿瘤(tumor)DNA LOH 与正常组织(normal)DNA 原理图(注:此图摘自 Nigro 等^[9])

表 2 各检测位点正常脑组织 DNA 2×2^{-ΔΔCt}95%置信区间

		检测位点								
		D1S450	D1S2783	D1S2737	D1S252	D1S453	D10S1690	D10S555	D19S900	D19S926
2×2 ^{-ΔΔCt}	下限	1.83	1.59	1.65	1.53	1.47	1.58	1.38	1.73	1.74
	上限	2.18	2.51	2.42	2.61	2.71	2.53	2.89	2.31	2.29

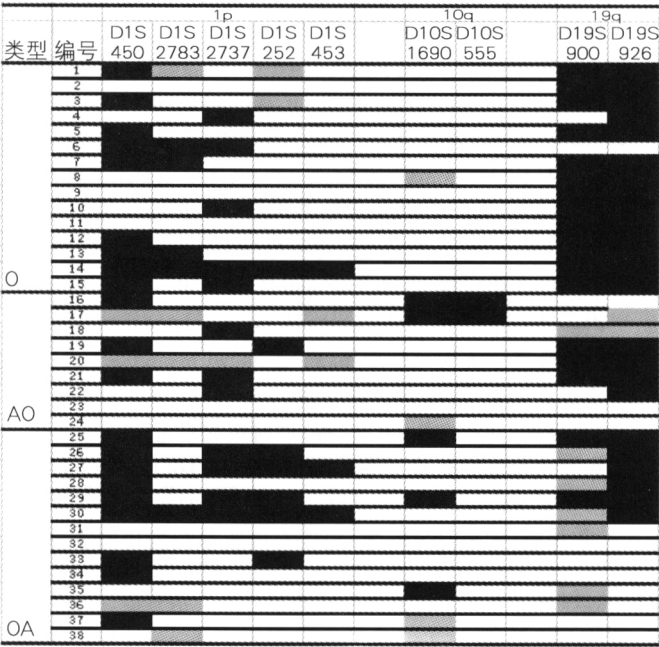
2 结果

少突胶质细胞肿瘤 1p、19q 和 10q 的检测结果显示图 2。

38 例少突胶质细胞肿瘤染色体中有 25 例发生 1p LOH;有 26 例发生 19q LOH;有 6 例发生单独的 1p LOH,4 例发生单独 19q LOH,有 21 例发生 1p/19q 联合性 LOH。见表 3。其中,82.6%(19/23)男性、46.6%(7/15)女性发生 1p LOH,两者相比具有显著性差异($P=0.033$, $P<0.05$)。

38 例少突胶质细胞肿瘤中有 5 例发生 10q LOH,其中 2 例单独发生 10q LOH 的,3 例与 1p/19q LOH 伴随出现。

38 例少突胶质细胞肿瘤中有 10 例出现个别微卫星位点(1p、19q、10q 上均有)的多倍体。见图 2。



注:黑色方格为 LOH;灰色方格为多倍体;白色为正常。

O:少突胶质细胞瘤 AO:间变型少突胶质细胞瘤 OA:少突星形胶质细胞瘤

图 2 少突胶质细胞肿瘤 1p、19q 和 10q LOH 检测结果

3 讨论

目前,1p/19q LOH 已成为国际上公认的预测少突胶质瘤患者化疗敏感性的独立指标,10q LOH 则从另一方面对少突胶质细胞肿瘤的诊断起到一定的提示

作用,在欧美国家已经广泛开展其检测工作,但是国内开展相关的检测及研究还比较少。

在 1p/19q LOH 的检测方面,国际上目前主要采用的方法有:PCR、荧光原位杂交(FISH)、比较基因组杂交技术(CGH)和变性高效液相色谱法(DHPLC)等。我们已建立 DHPLC 方法^[14-15],但操作步骤较多、难以实现高通量检测的目的。Nigro 等^[9]使用 QuMa 技术对 41 例少突胶质细胞肿瘤的 1p、19p、19q 和 10q LOH 情况进行检测,并以 FISH 法对其中的 23 例进行 1p/19q LOH 结果验证,结果显示以 FISH 法为金标准,QuMa 检测 1p、19q LOH 的敏感性分别是 92%、94%,特异性分别是 80%、100%,认为 QuMa 技术是一种敏感、特异、可靠的临床检测新方法。因此,本次实验参考 Nigro 等^[9]方法,并对其进行改良,建立了一套操作简便、结果准确、适合临床推广的检测方法。

本实验对 1p 上 5 个位点(D1S450, D1S2783, D1S2737, D1S252, D1S453)的检测结果显示,77.3%的少突胶质细胞瘤、55.6%的间变型少突胶质细胞瘤、64%的少突星形胶质细胞瘤发生 1p LOH,统计显示无显著性差异($P=0.604$),对 19q 上两个位点(D19S900、D19S926)检测,显示有 4 例发生 19q LOH,21 例发生联合性 1p/19q LOH,与 Nigro 等^[9]与张淑坤等^[13]的报道一致。同时发现,38 例患者中男性发生 1p LOH 的比例略高于女性,与崔向丽等^[16]报道不相符,可能与本次实验标本例数较少有关,仍需进一步探讨。

本实验对 10q 上的两个位点(D10S1690, D10S555)进行检测,其中 D10S1690 位于 10q23.3,在基因 PTEN 序列范围内,检测结果发现 38 例标本中有 5 例(13.2%)出现 10q LOH,间变型少突胶质细胞瘤 2 例、少突星形胶质细胞瘤 3 例,而少突胶质细胞瘤无 LOH,此外,2 例单独发生,3 例与 1p/19q LOH 伴随出现,并没有发现与 1p/19q LOH 呈负相关^[4-5],可能是与本次实验选取标本数较少有关,有待于扩大标本量进一步研究。如图 2 所示,同一个少突胶质细胞瘤患者可能同时存在 1p LOH, 19q LOH 及 10q LOH,提示胶质瘤的发生发展可能与多基因、多信号通路的异常变化有关。

本次实验还发现有部分标本出现多倍体结果(图 2),这一现象 Nigro 等^[9]也曾有报道。出现这一现象的原因可能是由于肿瘤 DNA 本身因此改变,也可能

是内参引物扩增的位点出现异常,考虑到这是肿瘤 DNA,发生这一情况不难理解;以异常的内参位点为参考,可以产生检测位点多倍体的结果。

与 Nigro 等^[9]与张淑坤等^[13]等的 QuMa 方法相比,本实验从以下几方面进行改进:①依据引物筛选标准重新选取的微卫星检测位点,重新进行引物以及内参引物群的设计。本次检测范围包括 1p 全段以及 10q,检测结果针对性更强。②引物方面设计除满足一般 QPCR 反应引物设计要求外,还考虑到扩增产物的序列,以保证探针可以与其结合并释放荧光信号。③探针较引物的 T_m 值高 $5^{\circ}\text{C} \sim 10^{\circ}\text{C}$,提高 PCR 反应的特异性。④为了进一步减小由于微小的扩增效率差异而引起的 ΔCt 值差异,对每一个位点进行了单独统计,更加保证每一个检测位点结果判断的精确性。因此,本文建立的检测方法定量更加准确,检测范围更广。

与我们已建立的 DHPLC 方法比较,本方法的优点为:①不需要对每一名患者进行抽血以获得正常对照 DNA;②闭管操作,避免污染和假阳性结果;③高通量、快捷;每个 96 孔板可同时检测 3 个标本,从而可快速检测出肿瘤组织染色体 1p、19q 和 10q LOH 的情况。

总之,我们采用改良的 QuMa 技术,建立了简便、快速、准确的 1p、19q 和 10q LOH 的检测方法,并证实 1p/19q LOH 是少突胶质细胞肿瘤较为常见的分子遗传学特征。少突胶质细胞肿瘤的与其他胶质瘤不同的分子遗传学和临床特征对于提高病理学上的诊断准确性、指导临床医生选择治疗方法、判断预后均有重要意义。

[参考文献]

- [1]Reifenberger G, Kros JM, Burger PC, et al. Oligoastrocytoma[M]. // Kleihues P, Cavanee WK. Pathology and Genetics of Tumours of the Central Nervous System. Lyon: IARC, 2000: 65—67.
- [2]Reifenberger J, Reifenberger G, Liu L, et al. Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p[J]. Am J Pathol, 1994, 145: 1175—1190.
- [3]Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, et al. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas[J]. J Natl Cancer Inst, 1998, 90: 1473—1479.
- [4]Sanson M, Leuraud P, Aguirre CL, et al. Analysis of loss

of chromosome 10q, DMBT1 homozygous deletions, and PTEN mutations in oligodendrogliomas[J]. J Neurosurg, 2002, 97: 1397—1401.

- [5]Thiessen B, Maguire JA, McNeil K, et al. Loss of heterozygosity for loci on chromosome arms 1p and 10q in oligodendroglial tumors: relationship to outcome and chemosensitivity[J]. J Neurooncol, 2003, 64: 271—278.
- [6]何杰,郑声琴,乔颖娟,等.少突胶质细胞肿瘤染色体 1p、19q 和 10q 杂合性缺失与临床预后的关系[J].临床与实验病理学杂志, 2006, 22(4): 444—448.
- [7]Kujas M, Lejeune J, Benouaich AA, et al. Chromosome 1p loss: a favorable prognostic factor in low-grade gliomas[J]. Ann Neurol, 2005, 58: 322—326.
- [8]Homma T, Fukushima T, Vaccarella S, et al. Correlation among pathology, genotype, and patient outcomes in glioblastoma[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2006, 65: 846—854.
- [9]Nigro JM, Takahashi MA, Ginzing GG, et al. Detection of 1p and 19q loss in oligodendroglioma by quantitative microsatellite analysis, a real-time quantitative polymerase chain reaction assay[J]. Am J Pathol, 2001, 158: 1253—1262.
- [10]Ino Y, Silver JS, Blazejewski L, et al. Common regions of deletion on chromosome 22q12.3-q13.1 and 22q 13.2 in human astrocytomas appear related to malignancy grade[J]. J Neuropathol Exp Neurol, 1999, 58: 881—885.
- [11]Mohapatra G, Bollen AW, Kim DH, et al. Genetic analysis of glioblastoma multiforme provides evidence for subgroups within the grade[J]. Genes Chromosom Cancer, 1998, 21: 195—206.
- [12]Jenkins RB, Blair H, Ballman KV, et al. A t(1;19)(q10; p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma[J]. Cancer Res, 2006, 66(20): 9852—9861.
- [13]张淑坤,卢德宏,朴月善,等.即时荧光定量 PCR 微卫星分析技术检测少突胶质细胞肿瘤染色体 1p/19q 杂合性缺失[J].中华病理学杂志, 2006, 35(12): 731—734.
- [14]李守巍,袁芳,江涛,等.变性高效液相色谱检测少突胶质细胞瘤 1p 杂合性缺失[J].中国康复理论与实践, 2009, 15(2): 120—122.
- [15]黄磊,江涛,袁芳,等.少突胶质细胞肿瘤的分子遗传学改变与其部位的相关性研究[J].中华神经外科杂志, 2009, 25(1): 61—64.
- [16]崔向丽,赵志刚,任晓辉,等.胶质瘤染色体 1p/19q 联合缺失特点分析[J].中华外科杂志, 2010, 28(11): 852—855.

(收稿日期:2010-12-10)