

视网膜母细胞瘤染色体基因组不稳定性分析

黄庆 府伟灵 彭智培 张雪 蔡光伟 张健辉

【摘要】目的 研究视网膜母细胞瘤(RB)肿瘤细胞基因组的遗传学改变及其位点所在基因组区域。

方法 以每例患者的外周血基因组为正常对照,采用基因杂合缺失(LOH)和微卫星不稳定(MSI)方法分析 15 例 RB 患者激光显微采样肿瘤细胞 19、20、21、22 和 X 染色体上 55 个微卫星位点的基因组不稳定性。 **结果** 15 例患者中,有 10 例(67%)在 5 条染色体的一个或多个位点上表现为基因组不稳定性[LOH 和(或)MSI],其中,染色体 19(33%)和 20(37%)的等位基因丢失频率高于其它染色体,D19S902 和 D19S571 间区域的高频 LOH 现象提示,19q13 区可能与视网膜肿瘤发生相关。根据 MSI 结果可划分出一个或多个位点发生 MSI 的 RB 亚群。 **结论** 首次提供了 RB 染色体 19 和 20 的 LOH 证据,并进一步证实了基因组不稳定性在 RB 肿瘤发生学中具有重要作用。

【关键词】 视网膜母细胞瘤; 杂合子丢失; 三核苷酸重复扩增; DNA, 卫星

中图分类号:R446.39 R739.7

Analysis of genetic instability of chromosome 19, 20, 21, 22 and X in retinoblastoma HUANG Qing^{*}, FU Wei-ling, PENG Zhi-pei, et al. ^{*} Department of Clinical Laboratory Centre, Southwest Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400038, China
Corresponding author: FU Wei-ling, Email: weilingfu@yahoo.com

【Abstract】Objective To explore the presence of common genetic alterations in retinoblastoma and to localize the altered genomic regions. **Methods** Genetic instability of chromosome 19, 20, 21, 22 and X of 15 microdissected retinoblastoma tumors were analyzed by the loss of heterozygosity (LOH) and microsatellite instability (MSI). **Results** Among the 15 patients with retinoblastoma, genome instability [LOH and(or) MSI] at one or more loci on the 5 chromosomes in 10 (67%), in which the loss of a single allele was more frequent in chromosomes 19 (33%) and 20 (27%) than in the other 3 chromosomes. High-frequency LOH between D19S902 and D19S571 suggested gene loci in the 19q13 region might be associated with tumor development in retina. According to the result of MSI, MSI occurred at least in one subset of retinoblastoma. **Conclusions** Our results provide first evidence of LOH in chromosomes 19 and 20 in retinoblastoma and further support the presence of genome instability in retinoblastoma that may play an important role in the tumorigenesis or progression of retinoblastoma.

【Keywords】 Retinoblastoma; Loss of heterozygosity; Trinucleotide repeat expansion; DNA, satellite

染色体 13q14 位点的 Rb1 基因突变或等位基因缺失 (allelic loss) 是视网膜母细胞瘤 (RB) 肿瘤发生学重要特征之一^[1]。但是,上述 Rb1 遗传学改变和(或) Rb1 蛋白的缺失并不能完全解释 RB 的发生^[2,3]。有研究结果提示 RB 患者除了染色体 13 存在基因组不稳定性现象之外,其它染色体的也同样存在,并且这些染色体的基因组不稳定性有可能参与了 RB 的发生发展^[4-8]。因此,在缩小基因组寻找范围的前提下,为了进一步确定与 RB 肿瘤发生学相关的关键性遗传学改变,我们应用基因扫描技术分析 RB 肿瘤细胞 19、20、21、22 和 X 染色体的 55 个微卫星标记基因杂合缺失 (LOH) 和微卫星不稳定 (MSI) 情况,从而确定了与 RB

肿瘤发生学相关的基因组新区域。

1 材料和方法

1.1 RB 肿瘤细胞和外周血标本的采集及其基因组 DNA 的制备

15 例配对肿瘤组织及其对应的外周血标本 (正常对照) 来自 1990 至 2000 年就诊于香港眼科医院的 RB 患者。其中男性 10 例 (7 例双眼, 3 例单眼), 女性 5 例 (4 例双眼, 1 例单眼), 发病年龄为 60~812 d。肿瘤组织标本制作成石蜡切片后经激光显微采样 (LCM, 美国 Arcturus 公司) 技术采集肿瘤细胞, 以确保肿瘤细胞的正确采集率 $\geq 90\%$ 。外周血和肿瘤细胞基因组 DNA 的提取按照试剂盒 (QIAmp DNA Mini Kit, 美国 Qiagen 公司) 说明书进行。

作者单位: 400038 重庆, 第三军医大学西南医院检验科 (黄庆, 府伟灵、张雪); 香港中文大学眼科与视觉科学系 (彭智培, 蔡光伟、张健辉)
通讯作者: 府伟灵, Email: weilingfu@yahoo.com

1.2 荧光标记微卫星半自动分析

19、20、21、22 和 X 染色体的遗传学改变分析采用中等分辨率的连锁分析试剂盒 (ABI Prism Linkage MappingSet-MD-10, 美国 PE Biosystems 公司), 该试剂盒的 55 个微卫星标记等分子于 19、20、21、22 和 X 染色体的不同位点, 其聚合酶链式反应 (PCR) 引物均为荧光标记。采用上述荧光标记引物, PCR 扩增微卫星片段后利用 ABI Prism 377 DNA Sequencer (美国 PE Biosystems 公司) 进行基因扫描, 基因扫描标准品采用 GenScan™-400HD [ROX] Size Standard (美国 PE Biosystems 公司), 基因扫描结果采用 GenScan V2.1 (美国 PE Biosystems 公司) 和 GenoTyper V2.0 (美国 PE Biosystems 公司) 分析 LOH 和 MSI 结果。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 12 min; 94℃ 下 15 s, 55℃ 下 15 s, 72℃ 下 30 s, 共 15 个循环; 89℃ 下 15 s, 55℃ 下 15 s, 72℃ 下 30 s, 共 35 个循环; 72℃ 延伸 12 min。

1.3 LOH 和 MSI 分析方法

对每个待分析微卫星标记, 患者外周血 DNA 作为正常对照, 用于确定等位基因的杂合性, 同时以 CEPH Individual 1347-02 人类基因组 DNA (美国 PE Biosystems 公司) 作为内部参照, 以确定微卫星 PCR 扩增片段大小的正确性。当微卫星标记所在等位基因是纯合子时, 即肿瘤组织和外周血基因组 DNA 基因扫描结果显示等位基因均只有一个峰, 称为 LOH 分析的非信息位点, 不再进行 LOH 分析; 反之, 则称之为 LOH 分析的有效信息位点, 并根据等位基因非平衡因子 (AIF) 判读 LOH 结果。AIF 的计算公式是 $AIF = (T1/N1)/(T2/N2)$, 其中 T1 和 T2 是肿瘤细胞基因扫描结果中等位基因的第 1 和第 2 个峰值高度, N1 和 N2 是相对应的外周血等位基因 (正常对照)

的第 1 和第 2 个峰值高度^[9,10]。为了便于后续分析, 当 $AIF < 1.00$ 时, 直接以 AIF 来判断等位基因非平衡性, 而当 $AIF > 1.00$ 时, 则以 AIF 的倒数 ($1/AIF$) 来判断, 从而使 AIF 值的大小始终在 0.00~1.00 范围内。当 $AIF > 0.5$ 时, 定义为等位基因维持 (正常或杂合性保留); 当 $AIF \leq 0.5$ 时, 则定义为 LOH (图 1)。AIF 值提示 LOH 阳性的标本均进行重复试验确认, 再以 2 次结果的 AIF 平均值来重新判断是否确实是 LOH。MSI 的确定标准: 当与对应的外周血正常细胞基因组等位基因相比, 肿瘤细胞由于微卫星标记所在重复序列的增加或减少而导致 1 个或 2 个等位基因出现大小变化, 从而在基因扫描结果中表现为多个峰的存在, 称之为 MSI 阳性 (图 1)。

1.4 统计学分析

所有的有效信息位点用于计算包括 LOH 和 MSI 在内的基因组不稳定性比例。 χ^2 检验用于分析上述基因组不稳定性与 RB 的病理及临床特征的相关性。

2 结果

2.1 LOH 分析结果

4 条常染色体 (19、20、21 和 22) 上微卫星标记共 37 个, 杂合率平均值为 82%, 其中 78% (29/37) 的微卫星标记杂合率 $> 75\%$ 。X 染色体上的 18 个微卫星标记杂合率仅有 28%。15 例患者中, 10 例 (67%) 患者在所有 5 条染色体 (19、20、21、22 和 X) 和 7 例 (46%) 患者在 4 条常染色体 (19、20、21 和 22) 上表现为一个或多个位点的等位基因丢失 [LOH 和 (或) MSI]。其中 19 号染色体占 33% (5/15); 20 号染色体占 27% (4/15); 21、22 号和 X 染色体分别各占 13% (2/15) (图 2)。LOH 的分析结果表明, 19 和 20 号染色体的等位基因

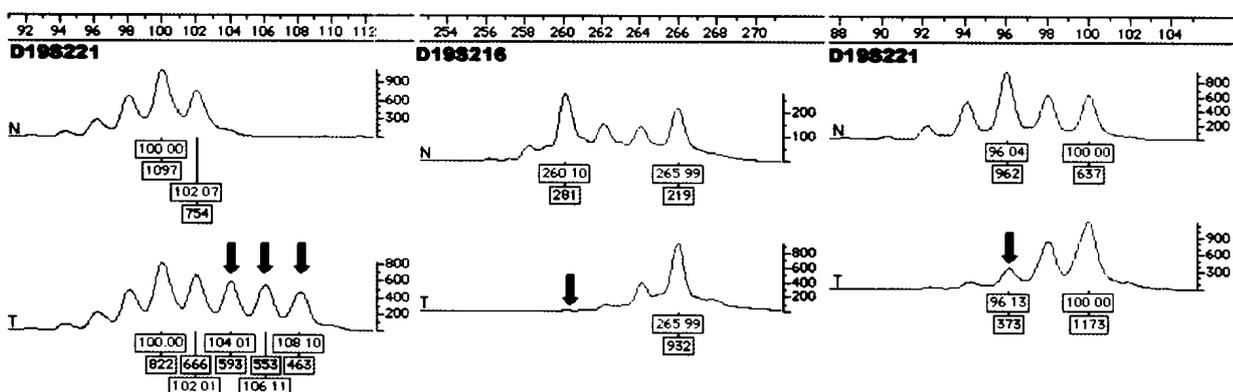


图 1 LOH 和 MSI 的基因扫描示例图。T: 肿瘤细胞; N: 正常外周血对照; X 轴: 碱基对大小 (绿色); Y 轴: 荧光单位 (红色); 黑箭: LOH 或 MSI 位点。D19S221 表现为 MSI; D19S216 表现为 LOH (较小等位基因完全丢失); D19S221 位点表现为 LOH (较小等位基因部分丢失, $AIF = 0.221$)

Fig. 1 Electropherogram of genes of LOH and MSI. T: tumor cells; N: corresponding normal peripheral blood samples; X-axis: size of basepairs (green); Y-axis: fluorescence units (red); Black arrows: locus of MSI or LOH. examples of LOH and MSI. MSI at D19S221, LOH at D19S216 (complete loss of smaller allele) and D19S221 (partial loss of smaller allele, $AIF = 0.221$)

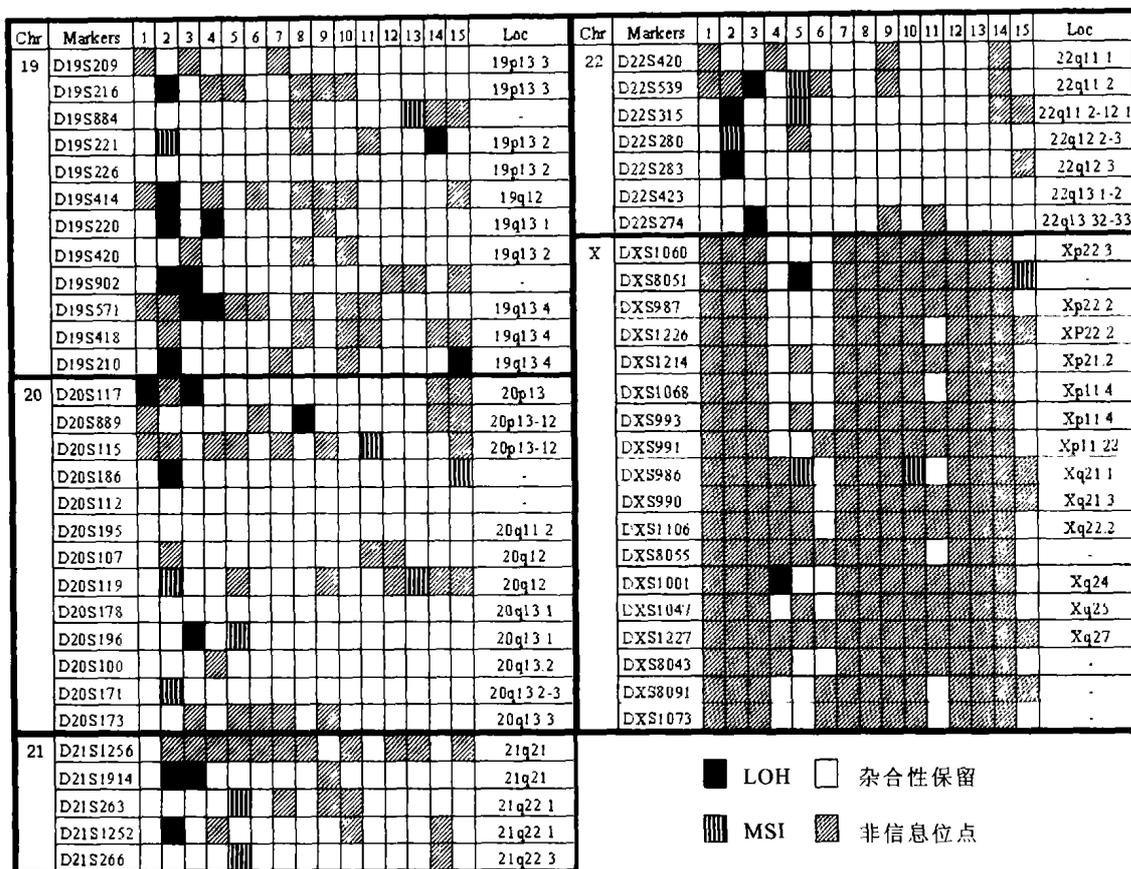


图 2 染色体 19、20、21、22 和 X 基因组不稳定结果示例图,Chr:染色体名称,每条染色体以一条粗黑线隔开;Marker:按照人类物理图谱顺序排列的微卫星标记;1~15:15 例 RB 患者;Loc:微卫星位点的物理图谱详细对应位点(“-”提示对应的物理图谱位点目前尚不清楚)。根据基因扫描结果,可将基因组不稳定分为 LOH、MSI、杂合性保留和非信息位点

Fig. 2 Sketch map of genome instability of chromosomes 19, 20, 21, 22, and X. Chr: name of chromosomes, in which each chromosome is delineated by a bold black line; Marker: microsatellite markers, in which all of the 55 markers are listed according to their order on human physical maps; 1-15: 15 cases of RB; Loc: detailed physical maps of location of each corresponding microsatellite marker (“-” indicates inaccurate location of the focus corresponding to the relative physical locations). Based on the results of gene scanning, genome instability can be divided into LOH, MSI, heterozygosity retention and not informative locus

■ LOH □ 杂合性保留
 ▨ MSI ▩ 非信息位点

丢失频率高于其它 3 条染色体。按照每个微卫星标记在 15 例患者中的有效信息位点(非信息位点以外的其它所有位点)计算,有 5 个微卫星标记在多名患者中发生 LOH,分别是 D19S902 (2/12)、D19S571 (2/8)、D19S220(2/14)、D20S117(2/12)和 D21S1914(2/14),位于 19 号染色体长臂的 D19S902 和 D19S571 之间的区域 LOH 发生率最高(20%, 3/15),LOH 的频率峰值则位于 19q13.4 的 D19S571(25%, 2/8)(图 2)。

与其它患者相比,有 2 例患者基因组不稳定现象较为突出,均在 4 条常染色体的一个或多个位点上发生等位基因丢失(LOH),其中,1 例在 19 号染色体的 10 个有效信息位点的 LOH 频率高达 40%(4/10),并且主要集中于染色体长臂(19q)(图 2)。

2.2 RB 亚群的 MSI 现象

4 条常染色体的 37 个微卫星标记中,有 2 例患者的 MSI 频率高于 4 个位点。进一步分析表明,根据 55 个微卫星标记中是否发生 MSI 可划分出一类 RB 亚群,这类 RB 亚群包括 6 例患者,其特征是在 55 个位

点中至少有一个位点发生 MSI(图 2)。

2.3 RB 基因组不稳定与病理和临床特征的相关性分析结果

15 例 RB 患者中,11 例为双眼 RB,4 例为单眼 RB。5 例女性患者中有 4 例为双眼 RB,而发生 LOH 的 8 例患者中,有 4 例为女性。双眼(6/11)和单眼(2/4)RB 的 LOH 发生率差异无统计学意义($\chi^2 = 0.24, P > 0.05$)。MSI 在发病年龄($\chi^2 = 1.250, P > 0.05$)与侧向性($\chi^2 = 0.024, P > 0.05$)之间差异无统计学意义。但是,有 3 例双眼 RB 患者均发生中等程度的 LOH 和(或)MSI,即 55 个位点中有 6 个以上的位点出现基因组不稳定。

3 讨论

我们探讨了 RB 患者的 19、20、21、22 和 X 染色体的遗传学改变及其与 RB 病理和肿瘤发生学的可能关联情况。微卫星标记在 4 条常染色体的较高杂合率(82%)确保了 LOH 频率分析的准确性,而 X 染色体

的较低杂合率可能与本研究中的性别分布有关(10 例男性和 5 例女性)^[3]。我们的研究表明,大分部 RB 细胞具有一定的 LOH 频率(1~9 个位点)。RB 患者在 19(33%)和 20(27%)染色体的 LOH 频率高于 21、22 和 X 染色体(均为 13%),低于相同方法在染色体 13 上检测到的 LOH 频率(12/16, 86%),我们推测可能与 Rb1 基因位于 13q14、且 Rb1 基因失活是 RB 发生的主要因素有关^[3]。在多名患者中发生 LOH 的 5 个微卫星标记(D19S902、D19S571、D19S220、D20S117 和 D21S1914)在其它肿瘤中也存在较高的 LOH 频率^[11-12]。研究结果提示,上述微卫星标记所在位点的相关基因可能参与了部分肿瘤的发生机制。以前的研究表明, RB 肿瘤细胞的 19、21、22 和 X 染色体存在染色体核型异常现象,且可能是与肿瘤发生、发展相关的染色体晚期重排^[6,7,14]。但是,本研究并未发现 RB 肿瘤细胞在上述 5 条染色体的基因组不稳定现象[LOH 和(或)MSI]与病理或临床特征有显著相关性。但是,相关性的缺乏可能受到标本数量较少(仅 15 例)的影响。因此,进一步加大病例数将有助于了解基因组不稳定[LOH 和(或)MSI]与病理和临床特征的相关性。

至今已报道了 10 例 RB 肿瘤细胞的 13qXp 转位(translocation)现象,提示 13qXp 转位可能与 RB 的发生发展相关^[15]。本研究中的女性患者在 X 染色体部分位点的 LOH 进一步证实了 RB 肿瘤细胞 X 染色体的基因组不稳定现象,但它是否与 13 和 X 染色体之间的重排相关还需要进一步研究确认。LOH 结果表明, RB 肿瘤组织中的一些特定位点更容易丢失等位基因,如染色体 19 长臂(19q)D19S902 和 D19S571 之间的区域发生高频 LOH,提示位于或接近 19q13 的基因可能参与 RB 的发生发展。此外,有 3 例患者均表现出较高的基因组不稳定性[LOH 和(或)MSI],提示 DNA 修复或维持系统的缺陷可能与 RB 的发生发展相关。尽管本研究中各位点所对应基因的功能并不清楚,但是,研究结果为 RB 遗传学不稳定提供了新的科学依据。

近期研究结果表明, RB 基因组不稳定的发生机制可能与体细胞不稳定和错配修复(MMR)的 DNA 修复基因启动子甲基化相关,如 hMLH-1^[16,17]。MMR 系统的功能是在 DNA 复制过程中修复 DNA 复制错误。MMR 系统缺陷细胞的突变率比正常细胞至少高 100 倍,而且,突变主要发生于微卫星序列,因此,MSI 被认为是细胞 MMR 缺陷的一个重要突变子表型,也是肿瘤高危标志之一^[18-20]。根据本研究中 5 条染色体的 MSI 发生频率可划分出在一个或多位点上发生

MSI 的 RB 肿瘤亚群。根据已有的研究结果,我们推测上述基因组不稳定可能与 MMR 基因的遗传学和(或)表观遗传学(epigenetic)缺陷直接相关。

综上所述,本研究结果证实了 RB 肿瘤细胞的 19、20、21、22 和 X 染色体均存在不同程度的基因组不稳定现象,并且可能与 RB 发生或进程相关,从而为 RB 肿瘤细胞的基因组不稳定特征提供了新的科学佐证。

4 参考文献

- Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1971, 68: 820-823.
- DiCiommo D, Gallie BL, Bremner R. Retinoblastoma: the disease, gene and protein provide critical leads to understand cancer. *Semin Cancer Biol*, 2000, 10: 255-269.
- 府伟灵,汪江华,张晓莉,等.视网膜母细胞瘤中基因杂合缺失现象的研究. *第三军医大学学报*, 2002, 4: 50-54.
- Horsthemke B. Genetics and cytogenetics of retinoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 1992, 63: 1-7.
- Cowell JK, Hogg A. Genetics and cytogenetics of retinoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 1992, 64: 1-11.
- Oliveros O, Yunis E. Chromosome evolution in retinoblastoma. *Cancer Genet Cytogenet*, 1995, 82: 155-166.
- Pogosianz HE, Kuznetsova LE. Nonrandom chromosomal changes in retinoblastomas. *Arch Geschwulstforsch*, 1986, 56: 135-143.
- Squire J, Phillips RA, Boyce S, et al. Isochromosome 6p, a unique chromosomal abnormality in retinoblastoma: verification by standard staining techniques, new densitometric methods, and somatic cell hybridization. *Hum Genet*, 1984, 66: 46-53.
- Cleton-Jansen AM, Callen DF, Seshadri R, et al. Loss of heterozygosity mapping at chromosome arm 16q in 712 breast tumors reveals factors that influence delineation of candidate regions. *Cancer Res*, 2001, 61: 1171-1177.
- Berney CR, Fisher RJ, Yang J, et al. Genomic alterations (LOH, MI) on chromosome 17q21-23 and prognosis of sporadic colorectal cancer. *Int J Cancer*, 2000, 89: 1-7.
- Smith JS, Tachibana I, Lee HK, et al. Mapping of the chromosome 19 q-arm glioma tumor suppressor gene using fluorescence in situ hybridization and novel microsatellite markers. *Genes Chromosomes Cancer*, 2000, 29: 16-25.
- Wang Q, Wang B, Guan X et al. Analysis of comparative genomic hybridization and loss of heterozygosity in 43 primary gastric carcinomas. *Chin Med J*, 2003, 116: 517-523.
- Nakamura M, Yang F, Fujisawa H et al. Loss of heterozygosity on chromosome 19 in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2000, 59: 539-543.
- Workman ML, Soukup SW. Chromosome features of two retinoblastomas. *Cancer Genet Cytogenet*, 1984, 12: 365-370.
- Mohandas T, Sparkes RS, Shapiro LJ. Genetic evidence for the inactivation of a human autosomal locus attached to an inactive X chromosome. *Am J Hum Genet*, 1982, 34: 811-817.
- Modrich P, Lahue R. Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem*, 1996, 65: 101-133.
- Choy KW, Pang CP, Yu CB, et al. Loss of heterozygosity and mutations are the major mechanisms of Rb1 gene inactivation in Chinese with sporadic retinoblastoma. *Hum Mutat*, 2002, 20: 408.
- Thomas DC, Umar A, Kunkel TA. Microsatellite instability and mismatch repair defects in cancer. *Mutat Res*, 1996, 350: 201-205.
- Maehara Y, Oda S, Sugimachi K. The instability within: problems in current analyses of microsatellite instability. *Mutat Res*, 2001, 461: 249-263.
- Zheng L, Flesken-Nikitin A, Chen PL, et al. Deficiency of retinoblastoma gene in mouse embryonic stem cells leads to genetic instability. *Cancer Res*, 2002, 62: 2498-2502.

(收稿日期:2003-10-24)

(本文编辑:朱敏)