

# STR 分型应用于病理标本污染的个体识别

王 峥<sup>1</sup> 聂同钢<sup>2</sup> 李敬永<sup>3△</sup>

(1 吉林大学白求恩医学院 吉林 长春 130021 ;2 天津市公安局物证鉴定中心生物物证室 天津 300384 ;

3 天津医科大学公卫学院 天津 300070)

**摘要** 目的 通过 STR 分型 ,对两例卵巢囊腺癌病理标本的组织细胞进行个体识别 ,以鉴别其中一例病理标本癌细胞是否源于污染。方法 对甲醛固定石蜡包埋组织 ,分别切片后在倒置显微镜下 ,用显微操作系统分离出不同形态的细胞团 ,对提取的 DNA 样本进行常规 STR 扩增检验。结果 经过 STR 分型比对 ,证实病理标本存在污染 ,其中一例的癌细胞来源于另一个体。结论 STR 分型是用于病理石蜡包埋组织标本污染个体识别的有效手段。

**关键词** 浆液性囊腺癌 标本污染 DNA 提取 STR 分型

中图分类号 R737.31 文献标识码 A 文章编号 :1673-6273(2012)01-86-04

## Application of Individual Identification through PCR-STR for Identifying Contaminated Pathological Samples

WANG Zheng<sup>1</sup>, NIE Tong-gang<sup>2</sup>, LI Jing-yong<sup>3△</sup>

(1 Bethnue Medical College of Jilin University Jilin Changchun Jilin, Changchun130021,China;

2 Institute of Forensic Science Tianjin Public Security Bureau Tianjin 300384;

3 Public Health College of Tianjin medical university Tianjin 300070)

**ABSTRACT Objective:** To use the STR typing to identify the two pathological samples of ovary cystadenocarcinoma, in order to identify whether one of two pathological samples was contaminated. **Methods:** Paraffin-embedded tissues were sliced and the different morphological cells were isolated by micro-operating system on inverted microscope. Extract DNA of the isolated cells, and get the genotype through regular PCR-STR method. **Results:** The genotype show the existence of contamination of the pathological samples and prove that cancer cells of sample were originated from the other sample. **Conclusion:** Individual identification through the PCR-STR method was the effective method to identify the contaminated pathological slice.

**Key words:** Cystadenocarcinoma; Contaminated samples; DNA extraction; STR typing

**Chinese Library Classification(CLC):** R737.31 **Document code:** A

**Article ID:**1673-6273(2012)01-86-04

临床病理外检标本中偶尔会遇到标本污染的问题,尤其是恶性肿瘤污染到非肿瘤标本中,如果不能准确鉴别将造成十分严重的后果,导致非肿瘤病人误诊、误治。

在司法鉴定实践中常有涉及疑调错病理标本的医疗纠纷、重大疾病保险理赔中诈保嫌疑以及亲子鉴定和刑事案件中个人身份认定等情况。需要调用存档的石蜡包埋组织作为 DNA 检验材料,而用 DNA 检验方法用于病理切片污染的尚不多见。现就应用 STR 分型技术对病理切片上的可疑来源癌细胞进行个体识别的病例介绍如下。

### 1 材料与方法

#### 1.1 临床资料

吴某,女,48岁,因子宫肌瘤合并卵巢囊肿住院治疗,手术行子宫次全切除及卵巢肿物切除,标本送病理检验。常规取材,脱水、浸蜡、包埋、切片,HE染色、阅片。诊断为子宫肌瘤,卵巢

浆液性囊腺癌(高分化)见图1、图2。阅片时有两点引起病理医生的疑惑:第一,癌细胞与相邻卵巢组织的细胞之间无任何渐变的过程,亦无间质浸润,且生长于包膜表面的癌细胞团范围过于局限。第二,临床上,病人没有恶性肿瘤的症状、体征,且肿瘤五项正常。为了慎重起见,考虑先排除是否为标本污染。追溯近期标本发现,两天前有一45岁女性李某诊断了卵巢浆液性囊腺癌(高分化)见图3、图4。经过多名病理专家的会诊,都未形成统一的意见,尤其是在高倍镜下(如图2、图4),更加难以确定癌细胞来源于污染。将吴某原蜡块连切染色后,切片上的癌细胞依然存在。将两份蜡块送到DNA实验室,对吴某、李某病理切片上肿瘤细胞及正常卵巢组织细胞进行个体识别。

#### 1.2 方法

将两份蜡块分别切片,厚度10μm,同时各连切5μm白片用于HE染色,置于Olympus-IX71型倒置式显微操作系统上,对照HE染色切片上癌细胞的位置,在4倍物镜下用机械臂控制钢针在切片上取癌细胞及卵巢实质的细胞。A为吴某癌细胞,B为吴某卵巢实质细胞,C为李某癌细胞,D为李某卵巢实质细胞。

依Promage公司组织毛发提取试剂盒及DNA IQ™纯化

作者简介:王峥(1989-),男,本科在读,13756657978

△通讯作者:李敬永(1963-),男,天津医科大学公卫学院副教授,长期从事社会医学的教学及科学研究工作,获国家级教学成果二等奖,参加国家及省部级课题多项。E-mail:lijingyong@tjmu.edu.cn  
(收稿日期:2011-05-30 接受日期:2011-06-25)

系统使用说明书<sup>[1]</sup>提取石蜡包埋组织核 DNA。应用 AB 公司 9700 型 PCR 仪按照 SinofilerTM 试剂盒标准体系进行扩增<sup>[2]</sup>，扩增产物在 3130XL 测序仪上检测，用 GeneMapper IDX 1.2 软件进行数据分析。

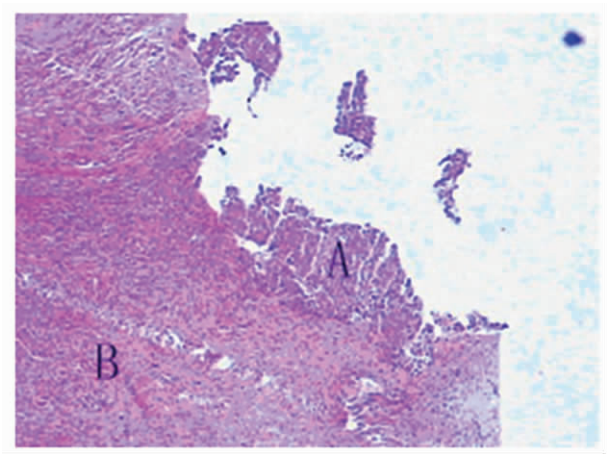


图 1 吴某卵巢肿瘤 HE× 40  
Fig.1 The sample (came from Miss Wu) show ovarian carcinoma(contaminated) HE× 40  
(A: Ovarian cancer cells; B: Ovarian real cells )

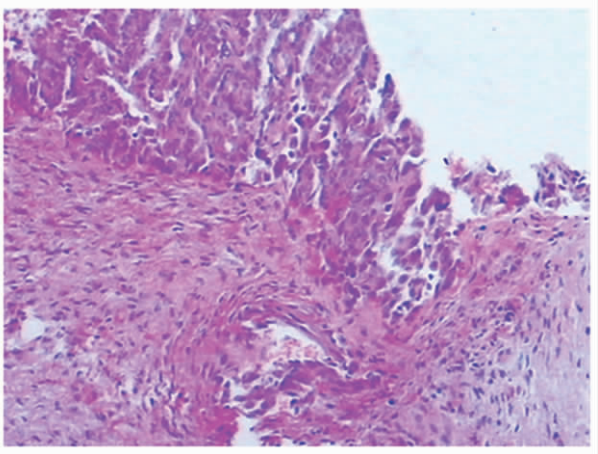


图 2 吴某卵巢肿瘤 HE× 100

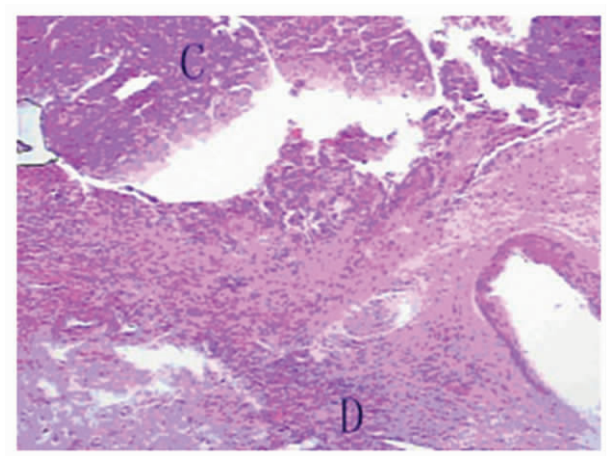


图 3 李某卵巢肿瘤 HE× 40  
Fig.3 The sample (came from Miss Li) show ovarian carcinoma HE× 40  
(C: Ovarian cancer cells; D: Ovarian real cells)

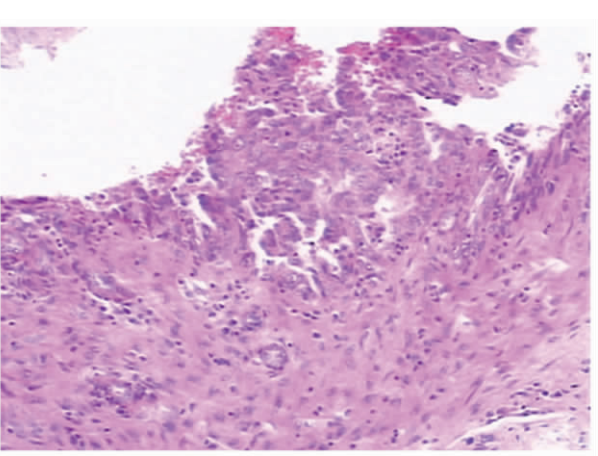


图 4 李某卵巢肿瘤 HE× 100

2 结果

如图 5678 所示，采用商品化试剂盒提取显微切割技术分离细胞的 DNA，STR 分型良好。李某病理切片上的癌细胞和卵

巢实质细胞与吴某病理切片上的癌细胞 STR 分型相同。而吴某病理切片上的癌细胞与卵巢实质的细胞 STR 分型不同，说明吴某病理切片上癌细胞的来源个体为李某。同时还显示李某患卵巢浆液性囊腺癌 FGA 基因座发生了变异(见图 5、6、7、8)。

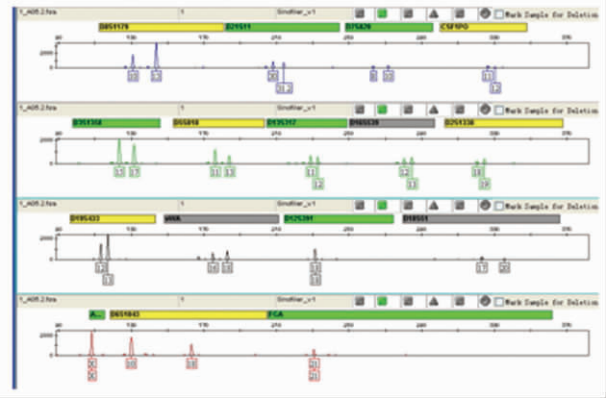


图 5 吴某(图 1 A 处)STR 分型图谱  
Fig.5 The genotype of cells isolated from A in FIG1

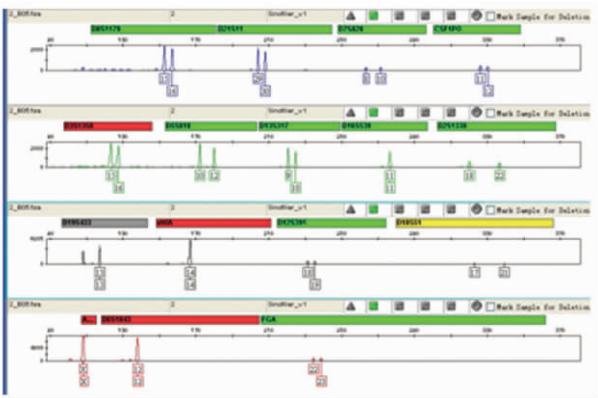


图 6 吴某(图 1 B 处)STR 分型图谱  
Fig.6 The genotype of cells isolated from B in FIG1

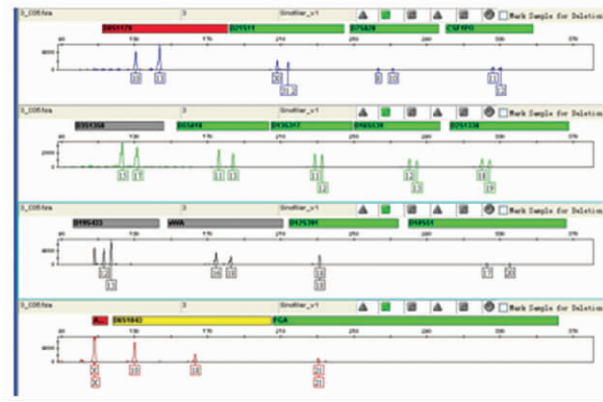


图 7 李某(图 3 C 处)STR 分型图谱

Fig.7 The genotype of cells isolated from C in FIG3

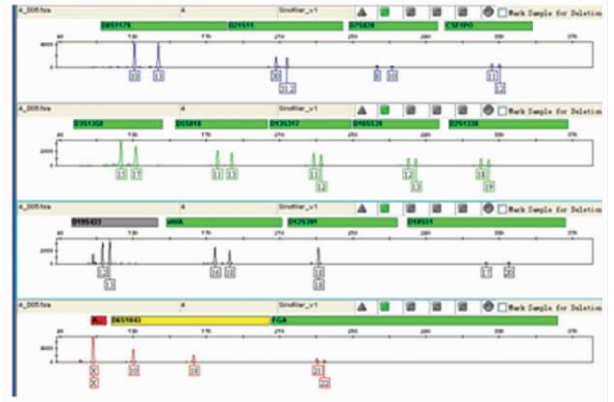


图 8 李某(图 3D 处)STR 分型图谱

Fig.8 The genotype of cells isolated from D in FIG3

### 3 讨论

卵巢浆液性囊腺瘤分为良性、交界性及恶性,最常由卵巢表面体腔上皮包涵性囊肿化生而来,被覆的上皮与输卵管上皮类似。浆液性囊腺瘤分为高、中、低分化三型,其中高分化的特点是细胞轻度异型,癌细胞浸润间质。浆液性囊腺瘤多由良性恶变产生,发病年龄多在 40-60 岁,5 年生存率约为 20%<sup>[3]</sup>。因此对于恶性度如此高的肿瘤,精确诊断对一个病人来讲意义非同寻常。

病理标本的污染在临床外检中是十分麻烦的问题,它可以出现在不同环节,如取材的板面、取材刀、剪刀、镊子等工具,脱水缸内标本残渣,包埋中器械清理不完全,漂片时水中的残片等等,总之,制片的各个环节均应该充分重视。从源头上防止标本污染的发生。

甲醛固定石蜡包埋组织(formalin fixed and paraffin embedded tissues,FFPET)是一种 DNA 检验成功率不稳定的检材。甲醛作为生物标本的保存液有渗透力强、防腐杀菌效果好、固定速度快等优点,但甲醛同时会引起 DNA 分子呈现可逆性亚氨基和氨基的羟甲基化,随固定时间延长,生物大分子之间缓慢形成广泛的亚甲基交联桥,导致 DNA 链的脆性增加,在受到剪切力作用时,更容易发生随机断裂<sup>[4,5]</sup>,且当溶液 pH 值低于 1 时, DNA 会在无缓冲溶液中直接降解成小片段<sup>[6]</sup>。目前对 FFPET 的 DNA 提取已发展了多种改良方法<sup>[7-9]</sup>,但仍存在不同程度缺陷。本文利用商品化的试剂盒,较好的解决了微量甲醛固定石蜡包埋组织 DNA 提取纯化的难题,STR 分型结果良好。

针对病理切片的 DNA 检验,常规方法是将整张病理切片上组织细胞全部提取,对单一个体来源的切片是可行的,但对有可能来源于不同个体的病理切片往往得到混合的 DNA 分型,或是仅检验出数量较多细胞的 DNA 分型,数量较少细胞的 DNA 分型被掩盖<sup>[10]</sup>。显微切割术(microdissection)是 90 年代初出现的一项新技术,它具有定位准确,可避免非靶细胞污染的缺点,尤其适用于某些良性、交界性和恶性肿瘤在演变过程中出现的基因异常,已成为分子生物学研究中的一种重要的技术手段<sup>[11]</sup>。本文通过显微切割技术,成功分离出来源于不同个体的细胞。

癌症发生的多基因参与和发生过程的异质性是癌症的重

要特点,这种异质性不仅表现于不同肿瘤之间,也表现在同种肿瘤的不同个体之间,其分型变异也是确定恶性肿瘤的一个证据。本病例的癌细胞变异发生在 Hum FGA 基因座,这是人  $\alpha$  血纤维蛋白基因第三个含子内的 STR 序列,定位于染色体 4q28,已检出 22 个等位基因。李某卵巢实质细胞 FGA 基因座的基因型为 21/22,而癌细胞为 21/21,其余的等位基因均相同。21 等位基因重复序列为 (TTTC)3 TTTT TTCT (CTTT)13 CTCC (TTCC)2,22 等位基因重复序列为 (TTTC)3 TTTT TTCT (CTTT)14 CTCC (TTCC)2<sup>[12]</sup>,显示其癌细胞的 Hum FGA 基因座 22 等位基因丢失一组 CTTT,变成 21 等位基因。甲醛固定石蜡包埋组织易出现不平衡扩增、丢失、pull-up 峰<sup>[5,13]</sup>,肿瘤组织及细胞也易出现等位基因丢失或突变,提示我们在个人识别中应谨慎考虑。

目前基因诊断恶性肿瘤尚停留在研究阶段,还没有针对某一肿瘤的特异性的基因。说明基因诊断技术的应用并没有成熟,但确给了我们很大启迪,虽然病变的基因不同,但是,可以根据肿瘤细胞基因的变化,来确定肿瘤的良恶性。因此,可以探索出一条病理与基因诊断技术相结合的诊断方法,在病理常规方法和免疫组化无法做出明确诊断的时候,考虑辅以基因检测,从而进一步提高诊断率,但 DNA 检验对实验室的条件要求严格,设备及试剂的费用昂贵,不适宜常规筛选。

DNA 检验是识别病理标本污染的有效手段,同时也是鉴别肿瘤良恶性的特殊方法,在其他常规手段不能很好解决的时候,STR 分型技术必将成为有效手段。

#### 参考文献(Reference)

- [1] DNA IQ™ System-Small Sample Casework Protocol[S]. Promega corporation, 2010
- [2] AmpFISTR® Sinofiler™ PCR Amplification kit User Manual[S]. ABI Corporation, 2008
- [3] 王淑贞.实用妇产科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2000,692-693  
Wang Shuzhen. Practical Obstetrics and Gynecology [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000, 692-693
- [4] Mies C, Houldsworth J, Chaganti RS. Extraction of DNA from paraffin blocks for Southern blot analysis [J]. Am J Surg Pathol, 1991, 15(2): 169-174
- [5] 谭卓毅, 丁梅, 王保捷. 福尔马林固定石蜡包埋组织中 DNA 提取[J]. 法医学杂志, 2006, 22(6): 455-458

- Tan Zhuoyi, Ding Mei, Wang Baojie. DNA extration from formalin fixed and paraffin embedded tissues [J]. Forensic Med. 2006, 22(6): 455-458
- [6] Gilbert MP, Haselkom T, Bance M, et al. The isolation of nucleic acids from formalin fixed paraffin embedded tissues-which methods are useful when [J]. PLoS One, 2007, 2(6): e537
- [7] 刘水平. 从石蜡包埋组织中获取高质量基因组 DNA 的方法改进 [J]. 生命科学研究, 2009, 13(4): 333-335
- Liu Shuiping. An improved method to get high quality of genome DNA from paraffin embedded tissues [J]. Life Science Research, 2009, 13(4): 333-335
- [8] 曹利平, Michael Duchrow, Rainer, 等. 改良一步法从甲醛固定石蜡包埋组织中提取 RNA [J]. 中华医学杂志, 2000, (80)5: 376-377
- Cao Liping, Michael Duchrow, Rainer, et al. An improved one step method to extract RNA from formalin fixed and paraffin embedded tissues [J]. Natl. Med J China, 2000, 80(5): 376-377
- [9] 牛青山, 辛阳, 林子清, 等. 甲醛固定标本 DNA 提取及荧光标记 STRs 复合扩增 [J]. 中国法医学杂志, 2003, 18(5): 292-293
- Niu Qinshan, Xin Yang, Lin Ziqing, et al. DNA extraction from formalin fixed samples and fluorescence labeled STRs amplification [J], Chinese Forensic Med, 2003, 18(5): 292-293
- [10] 郑秀芬, 纪贵金, 刘超, 等. 二组分混合 DNA 样品 STR 图谱解释 [J]. 中国法医学杂志, 2000, 15: 4
- Zheng Xiufen, Ji Guijin, Liu Chao, et al. the STR genotype explanation of two mixed DNA samples [J]. Chinese J of forensic medicine, 2000, 15: 4
- [11] 高志斌, 潘晓琳. 石蜡包埋组织显微切割后快速 DNA 提取技术 [J]. 农垦医学, 2003, 25(1): 50-51
- Gao Zhibin, Pan Xiaolin. An quick DNA extraction method after microdissection of paraffin embedded tissues [J]. Farm Med, 2003, 25(1): 50-51
- [12] 郑秀芬. 法医 DNA 分析 [M]. 北京: 中国人民公安大学出版社, 2002: 288-289
- Zheng Xiufen. Forensic DNA analysis [M]. Beijing: Chinese People's Public Security University Press, 2002: 288-289
- [13] 袁丽, 鲁涤, 杨雪. 甲醛固定石蜡包埋组织 DNA 检验 2 例 [J]. 中国人民公安大学学报(自然科学版), 2006, 4: 34-35
- Yuan Li, Nu Di, Yang Xue. Two cases of DNA examinations of formalin fixed paraffin embedded tissues [J]. Journal of Chinese People's Public Security University (science and technology), 2006, 4: 288-289
- (上接第 76 页)
- [8] Jawhar NM. Tissue Microarray: A rapidly evolving diagnostic and research tool [J]. Ann Saudi Med, 2009, 29: 123-127
- [9] 王筱冰, 张小翠, 夏妙红, 等. Caspase 的活化机制 [J]. 现代生物医学进展, 2006, 6(3): 53-55
- Wang Xiao-bing, Zhang Xiao-cui, Xia Miao-hong, et al. Activation mechanism of Caspase [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2006, 6(3): 53-55
- [10] Zhan Y, Vande WB, Wang Y, et al. The roles of caspase-3 and bcl-2 in chemically-induced apoptosis but not necrosis of renal epithelial cells [J]. Onogene, 1999, 18(47): 6505
- [11] Beale PJ, Rogers P, Boxall F, et al. BCL-2 family protein expression and platinum drug resistance in ovarian carcinoma Br J Cancer, 2000, 82(2): 436-440
- [12] Yang XH, Sladek TL, Liu X, et al. Reconstitution of Caspase-3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to Doxorubicin- and Etoposide- induced apoptosis [J]. Cancer Res, 2001, 61: 348-354
- [13] Rogers PM, Beale PJ, Al-Moundhri M, et al. Overexpression of BCL-2 in a human ovarian carcinoma cell line: paradoxical effects on chemosensitivity in vitro versus in vivo [J]. Int J Cancer, 2002, 97(6): 858-863
- [14] Yang X, Fraser M, Moll UM, et al. Akt-mediated cisplatin resistance in ovarian cancer: modulation of p53 action on caspase-dependent mitochondrial death pathway [J]. Cancer Res, 2006, 66(6): 3126-3136
- [15] Kleinberg L, Dong HP, Holth A, et al. Cleaved caspase-3 and nuclear factor-kappaB p65 are prognostic factors in metastatic serous ovarian carcinoma [J]. Hum Pathol, 2009, 40(6): 795-806
- [16] 万小云, 程蓓, 谢幸. 难治性与复发性卵巢癌的诊治问题 [J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2008, 24(1): 26-28
- Wan Xiao-yun, Cheng Pei, Xie Xing. Diagnosis and treatment of refractory and recurrent ovarian cancer [J]. Chinese journal of practical gynecology and obstetrics, 2008, 24(1): 26-28