

基于基因芯片的比较基因组杂交方法在分析非特指型外周 T 细胞淋巴瘤染色体改变中的价值评估

段瑞 张建中

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30771215)

作者单位:100101 北京市,解放军第 306 医院病理科

通讯作者:张建中, E-mail: zhangjz55@sina.com

【摘要】 目的 探讨基于基因芯片的比较基因组杂交(array-based comparative genomic hybridization, Array-CGH)方法检测非特指型外周 T 细胞淋巴瘤(peripheral T-cell lymphoma-not otherwise specified, PTCL-NOS)的分子遗传学改变特征的临床价值。方法 收集 2001 年 10 月至 2008 年 12 月 PTCL-NOS 患者组织标本 31 例,采用 1Mb Array-CGH 检测其基因变化,并用 Tile path Array-CGH 对检测结果进行验证。数据采用 SPSS 14.0 统计软件进行分析。结果 31 例 PTCL-NOS 标本中,有 17 例(54.8%)出现不同程度的染色体改变,且有基因改变的患者生存期明显短于无基因改变的患者,差异均有统计学意义(P 均 <0.05)。经 Tile path Array-CGH 检测验证,1Mb Array-CGH 检测的基因改变与 Tile path Array-CGH 检测的基因改变完全一致。结论 Array-CGH 可以全面快速检测与肿瘤相关的染色体改变,对研究淋巴瘤特异性遗传特征具有重要意义。

【关键词】 基于基因芯片的比较基因组杂交;非特指型外周 T 细胞淋巴瘤;分子遗传学;染色体改变

doi:10.3969/j.issn.1674-7151.2013.01.002

Assessment for the use of array-based comparative genomic hybridization in the genomic analysis of peripheral T-cell lymphoma

DUAN Rui, ZHANG Jian-zhong, Department of Pathology, 306 Hospital of PLA, Beijing 100101, China

【Abstract】 Objective To analyze the genetic changes in peripheral T-cell lymphoma-not otherwise specified (PTCL-NOS) with array-based comparative genomic hybridization (Array-CGH), and to discuss its clinical significance. **Methods** 31 tissue samples of PTCL-NOS patients were collected from October 2001 to December 2008. The gene change in PTCL-NOS was detected by 1MB Array-CGH, and the results was verified by Tile path Array-CGH. Data were analyzed by SPSS 14.0 statistical software. **Results** In 31 PTCL-NOS samples, there were 17 cases (54.8%) had gene changes in different levels. And the survival time of patients with gene change were shorter than patients without gene change obviously, the differences all had statistical significance (P all <0.05). The results of Tile path Array-CGH were exactly the same as that of 1Mb Array-CGH. **Conclusion** Array-CGH can analyze chromosomal changes related to the tumor and it's quite important for the research of genetic imbalances of lymphoma.

【Key words】 Array-CGH; PTCL-NOS; Molecular genetics; Chromosomal changes

淋巴瘤的发生是一个多阶段、多遗传变异累积的过程,而恶性淋巴瘤的病理诊断和治疗一直是临床病理的难点之一。各类淋巴瘤的诊断是以病理形态学特征为病理诊断的基石,以免疫组织化学、克隆分析作为辅助诊断,治疗上除传统的治疗方案,尚无特效的疗法,目前对于恶性淋巴瘤的诊断和治疗是研究的重点。采用分子病理学技术检测病理标本中淋巴瘤特征性的分子标记具有重要的参考价值,了

解淋巴瘤的遗传变异,对于阐明淋巴瘤的发病机制和发展过程具有重要意义。目前用于该研究的技术包括对肿瘤细胞进行核型分析、荧光原位杂交等分子生物学方法,但是这些技术均不能对肿瘤对整个基因组进行完整分析,因此不能全面评估其遗传学改变。基于基因芯片的比较基因组杂交(array-based comparative genomic hybridization, Array-CGH)技术能够同时准确地快速获取成千上万个基

因的遗传表达信息,成为检测肿瘤全基因组改变的好方法。本文采用 Array-CGH 技术,检测非特指型外周 T 细胞淋巴瘤(peripheral T-cell lymphoma-not otherwise specified, PTCL-NOS)的染色体改变,旨在探讨该技术对淋巴瘤的诊断价值。

1 材料和方法

1.1 标本来源 收集解放军 306 医院、山西省肿瘤医院、上海长海医院 2001 年 10 月至 2008 年 12 月病理科存档的 31 例 PTCL-NOS 患者的石蜡包埋组织标本,其中男性 21 例,女性 10 例,平均年龄(48.6±18.9)岁。所有标本均复习临床病理资料和免疫表型分析结果并进行随访,经过显微切割、DNA 提取和 DNA 质量检测,结合克隆性分析结果选取,用于 Array-CGH 分析。

1.2 仪器与试剂 切片机 RM2135 和烤片机 H11220(德国 Leica 公司)、电磁炉(富士宝, IH-H2035T)、压力蒸汽消毒锅(中国顺发, U22)、显微镜(Olympus, BX51)、离心机(长沙湘仪, 5415D)、水浴箱(上海森信, DK-8D)、紫外线分光光度仪(NanoDrop, ND-1000)、PCR 仪(Thermo Scientific, 9700)、电泳仪(Bio-Rad, Tocan240)、图像成像仪(苏州塞智, Champgel-3200); Ab1(CD3, Zymed)、Ab2(IgG)、DAB 显色剂(福州迈新)、QAamp DNA Micro Kit(Qiagen 56304)、Master PCR mix(InVivo-Scribe)。

1.3 1 Mb 分辨率 Array-CGH 使用覆盖整个基因组的 1 Mb 分辨率基因芯片(剑桥大学分子生物学研究所研制),对肿瘤组织的 DNA 进行 Array-CGH 分析^[1]。首先使用标记试剂盒(美国 Invitrogen 公司),对 400 ng 肿瘤 DNA 和对照 DNA 进行 Cy3 和 Cy5 标记;然后混合经标记且纯化的两组 DNA,分别加入 Cot-1 DNA(德国 Roche Diagnostics 公司)、鲑鱼精 DNA(美国 Sigma-Aldrich 公司)置于-80℃沉淀,1 h 后用杂交缓冲液溶解沉淀的 DNA 并杂交到芯片上。芯片在杂交前要用 Cot-1 DNA 和鲑鱼精 DNA 预杂交 5 h。芯片需在 37℃温箱反应 48 h。使用 Axon 4100A 扫描仪扫描 Array-CGH 的芯片,用 GenePix Pro 5.1 软件分析图像,用 Microsoft Excel 输出最终结果。根据 Cy5: Cy3 信号强度的比值来计算肿瘤 DNA 和对照 DNA 序列的不同处,测出肿瘤 DNA 有无获得和缺失。通常认为连续拷贝数变化代表染色体区域是真正的基因变化。

1.4 Tile path Array-CGH 由于 1 Mb 分辨率 Array-CGH 不能检测出低于 1 Mb 片段长度的改变,进而使用 Tile path Array-CGH 来证实 1 Mb 分辨率

Array-CGH 的结果。所用的 Tile path 芯片(剑桥大学分子生物学研究所研制)包括了 1, 6, 7, 14 号染色体,该种芯片包含了覆盖上述 4 条染色体的全部基因。使用该芯片分析了 9 例 DNA 样本,步骤和方法同 1 Mb 分辨率 Array-CGH。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 14.0 软件 Kaplan-Meier 方法对病例随访资料进行生存分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 1 Mb Array-CGH 分析结果 31 例 PTCL-NOS 患者标本中,有 17 例(54.8%)出现不同程度的染色体改变,包括基因的获得区域和缺失区域(见表 1)。31 例标本中有 25 例经生存分析后发现,这些染色体改变区域与 PTCL-NOS 的预后有关。由图 1 可见,有 10q 缺失的 PTCL-NOS 患者生存期短于无 10q 缺失的患者,有 12p13.1-13.2 缺失的 PTCL-NOS 患者生存期短于无 12p13.1-13.2 缺失的患者,差异均有统计学意义(P 均 < 0.05)。

表 1 1 Mb Array-CGH 分析 31 例

PTCL-NOS 患者标本频发性染色体改变(≥ 3 例)的区域

染色体名称	基因获得区域	基因缺失区域
1	1p36.13-1p36.32 1q21.1-1q23.3	1p21.2-1p12
3	3p24.2-3p24.3 3p13-3p14.3	
5	-	5q21.7-5q23.2 6q24.2-6q25.3
6	-	6q27 6q22.1
7	7q22.1 7p22.1-7p22.3 7q36.1-7q36.3 7q32.1-7q32.3 7q22.1-7q34	-
8	8q11.21-8q22.3 8q24.3	-
9	9p11.2-9q12 9q33.3-9q34.3	9p21.1-9p21.3
10	-	10q25.3-10q26.3 10p11.23-10q11.21 10q11.23-10q25.2
11	11p15.5	
12	-	12p13.1-12p13.2 12q24.11-12q24.3 13q14.11-13q14.3
13	-	13q21.3-13q22.2 13q13.3-13q14.3

2.2 Tile path Array-CGH 分析结果 采用高分辨率 Tile path Array-CGH 技术分析的 9 例 DNA 样本与 1 Mb Array-CGH 的分析结果完全一致, 见图 2。说明 1 Mb Array-CGH 检测 PTCL-NOS 标本基因改变情

况的结果是可信的。

3 讨论

本文研究采用 1 Mb 分辨率 Array-CGH 分析 31 例 PTCL-NOS 患者的分子遗传学改变特征, 结果显

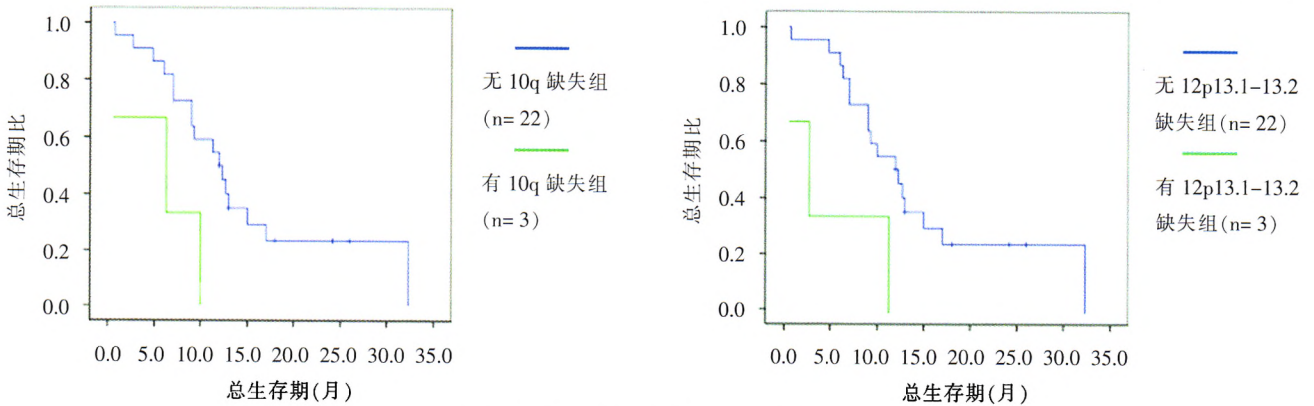


图 1 10q 和 12p13.1-13.2 缺失情况对 PTCL-NOS 患者预后的影响

注: 有 10q 缺失组与无 10q 缺失组比较, $P=0.025$; 有 12p13.1-13.2 缺失组与无 12p13.1-13.2 缺失组比较, $P=0.017$

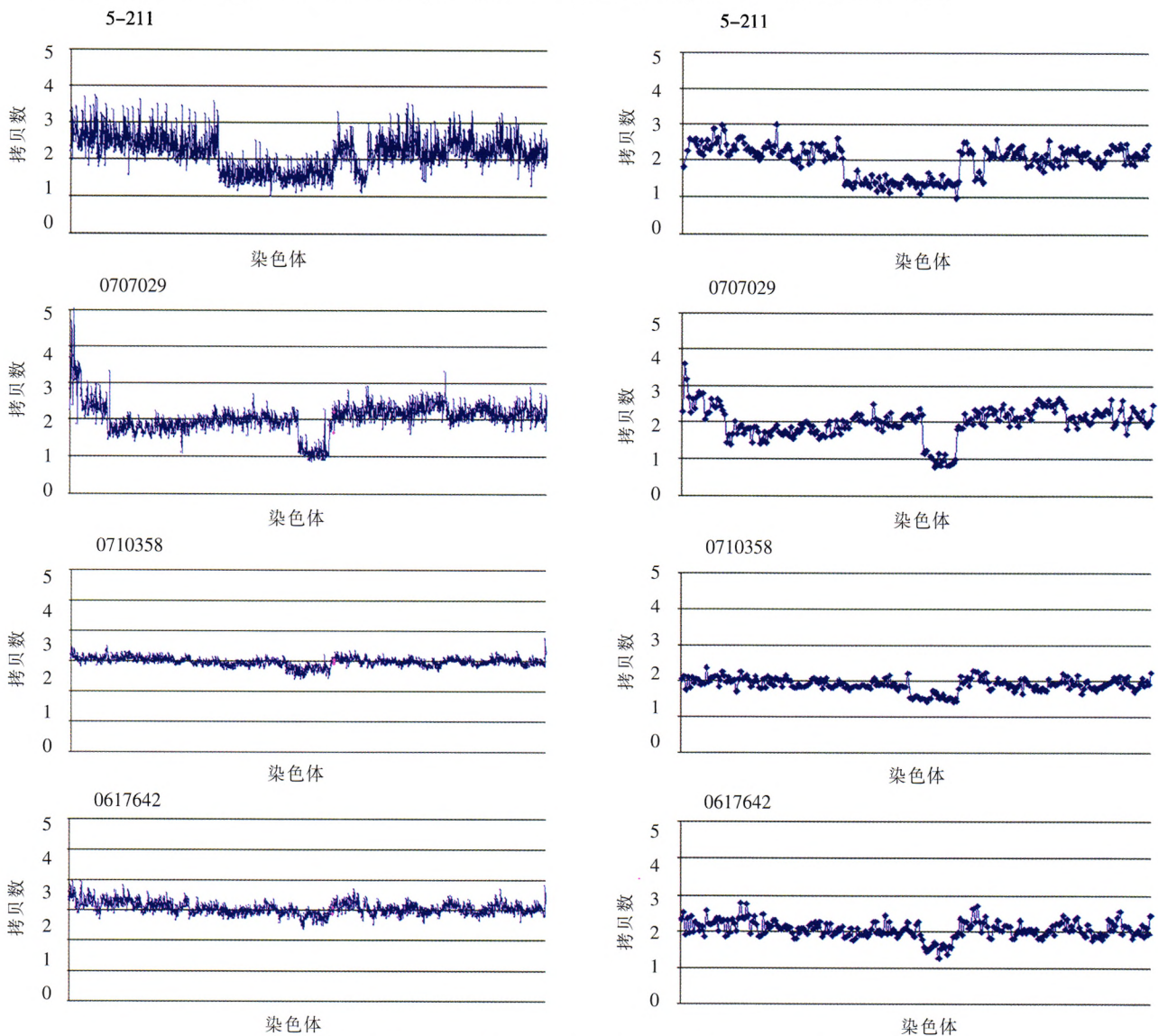


图 2 1 Mb Array-CGH 与 Tile path Array-CGH 检测结果比较

注: Tile path Array-CGH(左)检测结果显示: 4 例 PTCL-NOS 1p12-1p21.1 染色体片段出现基因缺失与 1MbArray-CGH(右)结果一致。

示 54.8% 的患者出现染色体异常改变, 对 10q 和 12p13.1-13.2 基因区域改变的患者进行生存分析发现, 有该基因缺失的患者生存期明显短于无该基因缺失的患者, 差异均有统计学意义 (P 均 < 0.05)。而这些区域的获得或缺失很可能包含多个基因, 可能存在与 PTCL-NOS 的发生、发展、治疗及预后等有着密切联系的基因, 为该疾病的研究提供了有力的依据。

比较基因组杂交技术是 1992 年由 Kallioniemi 等^[2]首先创建, 人们于上世纪 90 年代末发明了 Array-CGH^[3]。原理是用不同的荧光染料标记两组 DNA 与芯片 (微阵列) 靶 DNA 杂交^[4,5], 通过检测染色体上两种荧光信号的相对强度比率, 并将结果综合后通过软件加以分析, 得到微阵列每个靶点上的两种杂交信号的荧光强度比值, 反映待测基因组 DNA 在相应序列或基因上的拷贝数变化, 实现了操作的自动化和程序化。

Array-CGH 应用于临床遗传学主要优点: ①不需特殊探针或预先知道畸变发生部位, 只需一次杂交实验即可对整个基因组进行检测, 提供详细的染色体扩增或丢失信息, 且能定位 DNA 异常序列, 便于通过 FISH 或定位克隆等技术筛选相关基因; ②材料来源不受限制, 可取自任何部位及任何保存状态的肿瘤组织; ③所需 DNA 量极少, 即使是石蜡包埋组织, 仅需 2000 个细胞, 通过 PCR 扩增即可用于分析, 标记 DNA 最少需要 250 ng, 适合临床样品 DNA 的直接标记, 并可用于标记质量有所不足的 DNA 样品如来源于甲醛固定石蜡包埋的样品^[6]; 这些优点使其非常适用于发病率相对较低、取材不方便、肿瘤标本组织较少的淋巴瘤研究。

本文研究使用 Tile path Array-CGH 检测了 9 例患者染色体的变化, 结果显示染色体片段的改变与 1 Mb Array-CGH 结果一致, 进一步验证了 1 Mb Array-CGH 结果的可信性。而本文采用两种分辨率的 Array-CGH 检测时, 发现一些因素会影响实验结果: 1) DNA 的质量: 从新鲜冰冻标本中提取的 DNA 断裂少, 结果可信度高, 从石蜡包埋组织中提取的 DNA 断裂、降解严重, 如果 DNA 片段 ≥ 200 bp, 可以适用于基因芯片的实验, 结果仍是可信的, DNA 片段过小导致假阳性和假阴性的结果, 难以区分真正的染色体改变; 2) DNA 的总量: 通常从石蜡包埋组织中提取的 DNA 总量要控制在 300~400 ng, 量少会引起假阴性的结果, 量过多会影响杂交效果, 且会加重最终扫描图像后的背景; 3) 荧光信号标记: 标

本 DNA 荧光信号标记是否达标直接影响到最终结果, 所以荧光信号标记不达标绝不能进行下一步杂交实验, DNA 的质量在一定程度上也会影响荧光杂交的结果; 4) 芯片杂交和清洗: 要保证芯片的预杂交和杂交时间, 预杂交时间为 5-8 h, 杂交时间设置在 36-48 h, 当标本 DNA 质量较差时, 要适当延长杂交时间, 使标本 DNA 充分反应; 芯片的清洗效果会直接影响扫描的荧光信号, 清洗不彻底会造成背景颜色混乱、荧光信号减弱等现象, 会大大减少可用于数据分析的区域, 导致芯片的分辨率降低; 5) 信号扫描: 扫描芯片后会得到一个初步的荧光信号图像, 其中包含杂交信号过强、过弱或者杂交信号不全的图像, 要人工去掉这些不符合要求的杂交图像, 目的是消除由荧光杂交的误差引起的假阴性或假阳性结果, 提高结果的准确度; 6) 数据分析: 将荧光信号转换成图表信息后, 不能单单依靠设定的 log 数值来划分是否存在 DNA 的获得和缺失, 由于结果跟芯片的最初设计密切相关, 还要依靠经验来排除一些假阳性的结果; 7) 分辨率: 低分辨率的基因芯片成本低且效率高, 容易遗漏染色体小片段的畸变, 因此可以使用低分辨率的基因芯片初步筛选肿瘤全基因组染色体改变情况, 然后针对特定的染色体或染色体片段设计高分辨率的基因芯片, 进一步研究, 深入到小片段或具体拷贝进行研究, 从而达到节省成本和提高效率的目的。

Array-CGH 能够缩小重要的染色体异常区域的定位范围甚至精确到定位单个基因, 因而很有利于发现和确认肿瘤抑制因子及癌基因, 应用于实体瘤的研究具有独到之处。大量文献^[7-12]报道了 Array-CGH 应用于各种不同的肿瘤的研究。鉴于目前基因芯片的技术发展, 其分辨率的提高和价格的降低将使 Array-CGH 在肿瘤的临床诊断和治疗前景中的应用更加广泛。

志谢 感谢英国剑桥大学杜明清教授、刘宏祥博士、董格红博士, 首都医科大学宫丽平教授, 山西肿瘤医院朱明华教授和上海长海医院何妙侠副教授对本文的大力支持。

4 参考文献

- 1 Johnson NA, Hamoudi RA, Ichimura K, et al. Application of array CGH on archival formalin-fixed paraffin-embedded tissues including small numbers of microdissected cells. *Lab Invest*, 2006, 86:968-978.
- 2 Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, et al. Comparative genomic hybridization for Molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, 1992, 258:818-821.
- 3 Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, et al. Matrix-based com-

- parative genomic hybridization; biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chromosom Cancer*, 1997, 20: 399-407.
- 4 Dar M, Giesler T, Richardson R, et al. Development of a novel orange- and photo-stable HyPer5 red fluorescent dye for array CGH and microarray gene expression analysis with consistent performance irrespective of environmental conditions. *BMC Biotechnol*, 2008, 12: 86.
- 5 Stjernqvist S, Rydén T, Skold M, et al. Continuous-index hidden Markov modelling of array CGH copy number data. *Bioinformatics*, 2007, 23: 1006-1014.
- 6 Pinkel D, Albertson DG. Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer. *Nat Genet*, 2005, 37: S11-S17.
- 7 Zhu YQ, Zhu ZG, Liu BY, et al. Chromosomal alterations analyzed by comparative genomic hybridization in primary gastric carcinoma. *Chin J Gastrointest Surg*, 2007, 2: 160-164.
- 8 Tsuji K, Kawauchi S, Saito S, et al. Breast cancer cell lines carry cell line-specific genomic alterations that are distinct from aberrations in breast cancer tissues; comparison of the CGH profiles between cancer cell lines and primary cancer tissues. *BMC Cancer*, 2010, 4: 15.
- 9 Chanudet E, Ye H, Ferry J, et al. A20 deletion is associated with copy number gain at the TNFA/B/C locus and occurs preferentially in translocation-negative MALT lymphoma of the ocular adnexa and salivary glands. *J Pathol*, 2009, 217: 420-430.
- 10 Caserta D, Benkhalifa M, Baldi M, et al. Genome profiling of ovarian adenocarcinomas using pangenomic BACs microarray comparative genomic hybridization. *Mol Cytogenet*, 2008, 1: 10.
- 11 Sung JS, Park KH, Kim YH. Genomic alterations of chromosome region 11p as predictive marker by array comparative genomic hybridization in lung adenocarcinoma patients. *Cancer Genet Cytogenet*, 2010, 198: 27-34.
- 12 Robledo C, Garcia JL, Caballero D, et al. Array comparative genomic hybridization identifies genetic regions associated with outcome in aggressive diffuse large B-cell lymphomas. *Cancer*, 2009, 115: 3728-3737.

(收稿日期: 2012-11-06)

(本文编辑: 杨军)

消 息

2013 年临床基础检验及细胞学进展与应用培训班

北京协和医院、吴阶平基金会、北京市中西医结合学会将于 2013 年 4 月 18 日-20 日在北京共同举办“临床基础检验及细胞学进展与应用培训班”，结合北京协和医院检验和临床专家及部分院外专家多年来的工作经验，培训班将对临床基础检验常规工作中的热点问题讲解和讨论，如血细胞形态相关的临床病例讨论，尿有形成分、寄生虫及精子形态学判读，仪器性能验证及结果复检的应用体会，血栓止血实验指标的临床应用及质量保证的应用体会等。诚挚邀请从事临床基础检验与细胞学检验常规操作的技术骨干人员参加。会务费为 1000 元/人(含资料费和午餐费)，授予国家继续教育 I 类学分 6 分(北京地区参会人员请自带学分卡)。

1 培训内容

体液细胞形态学案例分析(刘贵建); 肠道寄生虫形态判读(张峰); 精子形态学判读(郭野); 血常规案例分析(张时民); 血常规性能验证和比对的应用案例(李建英); 血液寄生虫形态学判读(王庚); 尿管常规复检规则制定的体会(崔

巍); 尿液和体液常规复检的案例分析(陈雨); 尿液有形成分形态学判读(金晶); 凝血试验的临床病例分析(苏薇); 凝血试验质量保证的应用体会(吴卫); 血细胞形态病例分析(王欣、葛昌文)。

培训期间安排北京协和医院检验科新实验室参观。

2 培训时间及地点

培训时间: 4 月 18 日-20 日

培训地点: 北京协和医院住院楼四层多功能厅

3 联系人

于连辉

电话: 18610310063

E-mail: fishyu_918@yeah.net

陈倩

电话: 13426199396

E-mail: chenq43@yahoo.cn