

43 例肢端型黑色素瘤 MITF 基因扩增分析及其临床意义

王颖 朱利茹 郝静*

包头肿瘤医院 内蒙古包头 014030

摘要: 目的 分析 43 例肢端型黑色素瘤 MITF 基因扩增分析及其临床意义。方法 抽取 43 例 2018 年 10 月 -2022 年 10 月于我院接受治疗的肢端型黑色素瘤患者进行研究, 采集其石蜡包埋组织样本, 通过实时定量 PCR 法对 MITF 基因扩增情况进行检测, 并统计患者临床相关病理资料进行具体分析。结果 患者 MITF 基因扩增与临床病理特征之间的关系, 年龄、性别、分期、LDH、溃疡、标本来源各方面扩增与无扩增间对比 $P>0.05$, 表示无统计学差异; 在深度方面扩增与无扩增间对比 $P<0.05$, 表示统计学研究成立。结论 经研究, 肢端型黑色素瘤患者存在较高的 MITF 基因扩增率, 这与肿瘤存在的深度有很大关系, 这也说明肿瘤深度 $\geq 4\text{mm}$ 的患者的预后效果不理想。

关键词: 肢端型黑色素瘤; MITF 基因扩增; 临床分析

Amplification of MITF gene in 43 cases of acral melanoma and its clinical significance

Ying Wang, Liru Zhu, Jing Hao*

Baotou Tumor Hospital, 014030 Baotou, Inner Mongolia

Abstract: Objective To analyze the amplification of MITF gene in 43 cases of acral melanoma and its clinical significance. Methods: A total of 43 patients with acral melanoma treated in our hospital from January 2018 to January 2022 were selected for this study. The paraffin-embedded tissue samples were collected, and the amplification of MITF gene was detected by real-time quantitative PCR. Results The relationship between MITF gene amplification in patients and clinical pathological features was compared with respect to age, gender, staging, LDH, ulceration, and specimen source, and no statistically significant differences were found between amplification and non-amplification groups ($P>0.05$). However, in terms of depth, a statistically significant difference was observed between amplification and non-amplification groups ($P<0.05$), indicating that the study was statistically significant. Conclusion Acral melanoma patients have a higher rate of MITF gene amplification, which is closely related to the depth of the tumor, which also indicates that the prognosis of patients with tumor depth $\geq 4\text{mm}$ is not ideal.

Keywords: acral melanoma; MITF gene amplification; Clinical Analysis

黑色素瘤属于恶性肿瘤, 具有较高的病发率及病死率, 并且发病人数逐年上升。肢端黑色素瘤是黑色素瘤的一种特殊类型, 在我国发病率较高, 有相关研究指出, 其发病率占有 41.8%。肢端黑色素瘤主要发生在足跟、掌骨、足趾和甲下, 紫外线暴露极少。黑色素瘤这种疾病主要是由于紫外线导致皮肤灼伤诱导基因突变而造成的, 它对于身体的危害非常大, 如果我们错过了最佳的治疗时间, 肿瘤细胞很容易发生扩散和转移对接, 会对治疗造成非常大的困扰。发病机制尚不明确, 治疗主要依据其他类型皮肤黑色素瘤的治疗模式。小眼畸形相关转录因子 (microphthalmia-associated transcription factor, MITF) 是黑色素细胞生长、分化和生成的主要调控蛋白, 有助于黑色素瘤的发生、发展和转移^[1]。国外相关研究明确, 黑色素瘤中 MITF 基因扩增率约为 15% ~ 20%, MITF 扩增可区分进展迅速、病死率高的黑素瘤亚组, 并预测患者 5 年生存率下降。既往并没有相关肢端黑色素瘤的 MITF 基因扩增分析的报道。本文重点分析肢端型黑色素瘤 MITF 基因扩增分析及其临床意义。特别选取 43 例 2018 年 10 月 -2022 年 10 月于我院接受治

疗的肢端型黑色素瘤患者进行研究, 具体如下。

一、资料与方法

1.1 一般资料

抽取 43 例 2018 年 10 月 -2022 年 10 月于我院接受治疗的肢端型黑色素瘤患者进行研究, 患者年龄区间: 30 例 ≥ 65 岁者占比 (69.77%), 13 例 <65 岁者占比 (30.23%); 其中男性患者、女性患者占比分别为 23 (53.49%)、20 (46.51%); 对黑色素瘤进行临床分期, 8 例患者为 I 期占比 (18.60%), 13 例为 II 期占比 (30.23%), 7 例为 III 期占比 (16.28%), 15 例为 IV 期占比 (34.88%); 有 33 例 LDH 正常者占比 (76.74%), 10 例 LDH 升高者占比 (23.26%)。

纳入标准: ① 通过采集患者的肿瘤组织石蜡包埋标本, 进行病理学检查, 均确诊为黑色素瘤。② 经过沟通, 所有患者均自愿签订同意书。③ 患者临床资料完整, 积极配合整个研究过程。

1.2 方法

1.2.1 检测试剂

石蜡组织全基因组 DNA 提取试剂盒 QIAampDNA FFPE

组织试剂盒购自 Qiagen(美国)。实时定量 PCR 相关试剂 SYBR Green Master-mix 购自北京康威世纪生物技术有限公司^[2]。

1.2.2 MITF 基因扩增检测

从石蜡包埋组织中手动分离肿瘤细胞, 并按照 QIAamp DNA FFPE 组织试剂盒提取肿瘤 DNA 以备后续使用^[3]。实时荧光定量 PCR (SYBR green dye 法) 检测黑色素瘤 MITF 基因扩增情况。PCR 引物由北京天翼汇源生物科技有限公司合成, 序列如下: MITF 序列上游引物为 5' -AAACCCACCAAGTA-CCACA-3', 下游引物为 5' -ACatGGCAagctCAC-GAC-3'。内参基因 LINE1 的上游引物为 5' -AAAGCCG-CTCAACTACATGG-3', 下游引物为 5' - tgcittg - aatgcgtccagg -3'。抗尸体体系: 2 × μL tra-SYBR Mix 12.5 μL, 上游引物 (10 μmol/L) 0.5 μL, 下游引物 (10 μmol/L) 0.5 μL, 模板 DNA 2 μL, RNase-free 水 9.5 μL。RT-PCR 反应条件为 95℃ 初始变性 10 min, 95℃ 初始变性 15 s, 57℃ 初始变性 20s, 72℃ 初始变性 32s, 循环 40 次。在 72℃ 下延长 32 s。反应在 ABI 7500 (Applied biosystems -tems) 上运行, 并且自动设置 CT 阈值。实验中设置 4 个重孔, 以保证重孔之间的 CT 差小于 0.5。每个样品 > 重复 2 次^[4]。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件对研究所得的数据进行统计分析, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$)

表示, 并用 t 检验, 计数资料采用频数及百分号表示, 行卡方检验, 以 P<0.05 判断差异是否具有统计学意义。

二、结果

表 1 分析瘤患者 MITF 基因扩增与临床病理特征之间的关系

临床病理参数	扩增 n (%)	无扩增 n (%)	P	
年龄	<65 岁	7 (53.85%)	6 (46.15%)	>0.05
	≥ 65	15 (50.00%)	15 (50.00%)	
性别	男	13 (56.52%)	10 (43.48%)	>0.05
	女	8 (40.00%)	12 (60.00%)	
分期	I	3 (37.50%)	5 (62.50%)	>0.05
	II	9 (69.23%)	4 (30.77%)	
	III	3 (42.86%)	4 (57.14%)	
	IV	7 (46.67%)	8 (53.33%)	
LDF	正常	17 (51.52%)	16 (48.48%)	>0.05
	升高	3 (30.00%)	7 (70.00%)	
溃疡	有	18 (56.25%)	14 (43.75%)	>0.05
	无	4 (36.36%)	7 (63.64%)	
标本来源	原发灶	10 (40.00%)	15 (60.00%)	>0.05
	转移灶	10 (55.56%)	8 (44.44%)	
深度 (mm)	≥ 4	16 (66.67%)	8 (33.33%)	<0.05
	<4	7 (36.84%)	12 (63.16%)	

三、讨论

肢端黑色素瘤是亚洲黄种人人群中最常见的黑色素瘤亚型, 在欧美白人人人群中很少发生。该亚型发病机制复杂, 确诊时通常已进入侵袭性生长阶段, 不利于预后。肢端黑色素瘤是属于黑色素瘤的一种, 是所有皮肤肿瘤中恶性程

度最高的, 容易出现复发和转移, 早发现、早诊断、早治疗能够进一步的提高生存。对于早期肿瘤, 首选手术治疗, 对原发病灶进行扩大切除手术, 以控制病情的发展^[5]。术后行前哨淋巴结活检, 防止肿瘤淋巴结转移。如果发现淋巴结阳性, 应该进行淋巴结清扫, 以降低疾病复发及转移的几率^[6]。术后辅助治疗, 根据分期选择不同的治疗方案, 一般给予大剂量的干扰素进行辅助治疗, 如合并 BRAF 突变可以给予 BRAF 抑制剂或者选择免疫辅助治疗, 以降低肿瘤复发、复发转移的风险, 延长患者的生存。目前 KIT 突变成肢端黑色素瘤的靶向治疗的主要靶点之一, 在肢端和粘膜黑色素瘤中更常见。其他肢端黑色素瘤的治疗模式基本遵循躯干及头面部皮肤黑色素瘤的治疗。所以为了寻找诊断黑色素瘤的有效治疗靶点, 文章中对肢端黑色素瘤进行 MITF 基因扩增分析。MITF 基因位于 3 号染色体 3p13.3-3p14.1 上, 全长 228.9 kb, 由 23 个外显子组成。编码的 MITF 蛋白属于 Myc 转录因子超家族^[7]。参与调控黑素细胞的生长、分化以及黑素细胞的增殖、存活、转移和侵袭。随着 MITF 表达水平和活性的变化, MITF 可发挥促进肿瘤生长和抑制肿瘤生长的双重功能。MITF 表达的上调伴随着细胞增殖程序的启动, MITF 表达的下调伴随着 "干细胞样停滞浸润" 阶段的出现^[8]。这种可逆转化是原发肿瘤侵袭转移的必要因素, 也是黑色素瘤异质性和耐药性的重要因素。人体非细胞区黑素细胞的密度比皮肤其他部位低约五倍, 黑色素瘤更容易发生在黑素细胞被抑制的区域。

MITF 基因表达在黑色素瘤中的意义已被广泛探讨^[9]。Salti 等发现 MITF 蛋白水平与中等厚度 (1 ~ 4 mm) 皮肤黑色素瘤患者的总生存期呈正相关。有关报道 MITF 基因在黑色素瘤中的扩增预示着患者总体生存期的缩短, MITF 扩增的黑色素瘤细胞系对化疗具有相对的耐药性。MITF 活性下调可增加肿瘤细胞对化疗的敏感性。此外, 本课题组前期研究也发现, MITF 扩增的黑色素瘤患者接受恩度联合达卡巴嗪治疗, 治疗效果比未扩增 MITF 的组更差^[10]。本次研究结果显示, 患者 MITF 基因扩增与临床病理特征之间的关系, 年龄、性别、分期、LDH、溃疡、标本来源各方面扩增与无扩增间对比 P>0.05, 表示无统计学差异; 在深度方面扩增与无扩增间对比 P<0.05, 表示统计学研究成立。且本研究结果提示 MITF 扩增与患者年龄、疾病分期、LDH 水平等因素无明显相关性, 而厚度分析显示 MITF 扩增的肢端黑色素瘤患者浸润厚度明显大于未扩增的患者。推测 MITF 的扩增可能与蛋白表达水平升高, 从而上调黑色素瘤细胞增殖和侵袭基因的表达有关。前期研究证实 MITF 可以通过参与调节 TBX2、Bcl2、HIF-1α 等基因的表达, 促进细胞增殖, 抑制枯萎。最近, Ullrich 等人发现 MITF 可以正向调节 CEA 相关的细胞粘附分子 1, 也可以促进肿瘤细胞浸润。

综上所述, 经研究, 肢端型黑色素瘤患者存在较高的 MITF 基因扩增率, 这与肿瘤存在的深度有很大关系, 这也说明肿瘤深度 ≥ 4mm 的患者的预后效果不理想。

参考文献:

[1] François Sandy, Adler Colin H., Flowers Nyla I. et al. 26207 Data extraction accuracy in stage III melanoma from a

clinical data warehouse[J] *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2021, 85(3S)

[2] 刘芳君, 蓝吴涛, 李鹏飞, 等. 茶多酚对小鼠黑色素瘤细胞 B16F10 体外增殖和迁移的影响 [J]. *中国畜牧兽医*, 2022, 49(4):1280–1286.

[3] 张充, 魏子璇, 王敏, 等. 利用 CRISPR/Cas9 在人类黑色素瘤细胞中编辑 MC1R 与功能分析 [J]. *遗传*, 2022, 44(7):581–590.

[4] 朱芷葳, 蓝吴涛, 马悦悦, 等. 大蒜素对小鼠黑色素瘤 B16F10 细胞体外增殖和迁移能力的影响 [J]. *畜牧兽医学报*, 2021, 52(3):831–838.

[5] 张丽, 李杰, 付琳, 等. LncRNA TCONS_00153149 基因在酉州乌羊皮肤黑色素沉积过程中的作用 [J]. *农业生物技术学报*, 2022, 30(5):908–917.

[6] Fukumoto T., Hristova D., Hua X. et al. 295 The role of

NUMB in melanoma[J] *Journal of Investigative Dermatology*, 2021, 141(10S)

[7] 张珂, 朱豫, 王丽丽, 等. miR-34a 对葡萄膜黑色素瘤细胞生物学行为的抑制作用及其机制 [J]. *中华实验眼科杂志*, 2019, 37(5):326–331.

[8] Bussu F. SP-0092 This house believes that surgery should be considered for nose high risk non-melanoma skin cancer [J] *Radiotherapy and Oncology*, 2021, 158(S1)

[9] 姜轩, 付超, 赵瑞利, 等. 新 RGD 嵌合体肽对黑色素瘤细胞 B16 增殖及其黑色素合成的影响 [J]. *中国预防兽医学报*, 2019, 41(9):951–957.

[10] 姬凯元, 范瑞文, 张俊珍, 等. 小鼠正常黑色素细胞与黑色素瘤细胞 (B16) mRNA 表达差异分析 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2019, 35(1):92–100.

通讯作者: 郝静