

# 家族性腺瘤性息肉病患者 APC 基因胚系突变的初步研究

楼 征\*, 于恩达, 孟荣贵, 傅传刚, 刘连杰, 徐晓东, 王 颢, 郝立强

(第二军医大学长海医院普通外科, 上海 200433)

**[摘要]** **目的:**探讨国人家族性腺瘤性息肉病(FAP)患者 APC 基因胚系突变的特点。**方法:**对我院 2004 年 3 月至 2005 年 3 月收治的 6 例 FAP 患者运用 PCR-变性高效液相色谱技术检测 APC 基因,对可疑突变者进行测序。**结果:**变性高效液相色谱检测共发现 3 个可疑突变片段,经 DNA 测序证实 3 个片段均存在突变。其中,15 号外显子 2 例,14 号内含子 1 例。**结论:**国人 FAP 患者相同基因型 APC 基因突变可有不同表现型。

**[关键词]** 腺瘤息肉病, 结肠; APC 基因; 突变

**[中图分类号]** R 735.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)04-0358-04

## Germline APC gene mutation in patients with familial adenomatous polyposis: a preliminary study

LOU Zheng\*, YU En-da, MENG Rong-gui, FU Chuan-gang, LIU Lian-jie, XU Xiao-dong, WANG Hao, HAO Li-qiang (Department of General Surgery, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To explore the characteristics of germline APC gene mutations in Chinese patients with familial adenomatous polyposis(FAP). **Methods:** Six FAP patients (March 2004 to March 2005) were screened for germline mutation of APC gene by PCR-denaturing high-performance liquid chromatography and direct sequencing. **Results:** Mutations were identified in 3 patients from 6 unrelated families. The first and second mutation was at codon 1 509, resulting in an amino acid change from Arginine to Glutamine; the third mutation involved four-base-pairs insertion in the sequence of AGAA at intron 14. **Conclusion:** Chinese FAP patients with same APC genotype mutation may have different phenotypes.

**[KEY WORDS]** adenomatous polyposis coli; APC gene; mutation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(4): 358-361]

家族性腺瘤性息肉病(FAP)发生的分子遗传学基础是 APC 基因的突变,近年来随着分子生物学技术的发展,基因筛查诊断给我们提供了一个更先进的 FAP 早期诊断方法,并成为诊断无临床表现的 FAP 致病基因携带者最准确的方法之一。国内相关研究不多,且多集中于 15 号外显子的研究。本实验研究了 6 例不同家系的 FAP 患者 APC 基因全部外显子和部分包含剪接位点的内含子突变情况,初步探讨了中国人 FAP 患者 APC 基因胚系突变的特点,旨在为中国人 FAP 患者遗传咨询、家系遴选、大肠癌防治和大肠外表现防治提供理论基础。

### 1 材料和方法

1.1 研究对象 2004 年 3 月至 2005 年 3 月于我院诊断和治疗的 6 例不同家系的 FAP 患者。分别来自上海、浙江、江苏、安徽四地,其中男 4 名,女 2 名,平均年龄 27 岁(21~40 岁)。

1.2 方法 进行遗传学咨询和获取书面知情同意后,抽取 FAP 患者外周静脉血 10 ml,以 0.5 mmol/L 1 ml 的 EDTA 抗凝。根据小量血液基因组 DNA 抽提试剂盒说明进行(杭州维特洁生物科

技公司)。利用 PCR 反应扩增 APC 基因 15 个外显子,引物序列参照文献<sup>[1]</sup>(表 1、2),由上海生工生物工程技术有限公司合成,引物稀释成 20 μmol/L 母液,分装后备用。扩增产物序列突变筛选采用变性高效液相色谱分析(denaturing high performance liquid chromatograph, DHPLC)检测(北京德博全基因检测技术研究所)。PCR 扩增产物经 DHPLC 分析后可疑突变者直接测序(上海生工生物工程技术有限公司)。

### 2 结果

6 例 FAP 患者中,4 例有家族史,2 例无明确家族史。所有患者大肠内腺瘤数目均超过 100 枚。未发现大肠腺瘤癌变患者。伴发食管息肉 1 例,十二指肠息肉 1 例,甲状腺癌 1 例。APC 基因胚系突变检出 3 例(50%),其中,15 号外显子 2 例,14 号内含子 1 例,见表 3 和图 1。

[作者简介] 楼 征,博士,主治医师。

\* Corresponding author. E-mail: louzhengpro@yahoo.com.cn

表 1 APC 基因 1~14 号外显子 PCR 引物  
Tab 1 PCR primers for 1-14 exon of APC gene

Exon	Primers	Sequences(5'-3')	Size(bp)	Annealing(°C)
1	1-F	TTT CTT TAA AAA CAA GCA GCC A	519	56.8
	1-R	CAC AGA AAA CCT TGC CTC AG		
2	2-F	AAG GTG CGT GCT TTG AGA GT	308	56.8
	2-R	ACC AAC ACC CAA ATC GAG AG		
3	3-F	CCA AGT GGA CTT TTC AGG GA	412	50.2
	3-R	CTG GAG TAC ACA AGG CAA TGT T		
4	4-F	GCT CTT CTG CAG TCT TTA TTA GCA	444	52.0
	4-R	CCT AGT TGA ACC CTG AGG TCC		
5	5-F	AAG CCA CTT GTG ACT TTG GC	511	50.2
	5-R	GTT GCT CAG CAG CCA TGA TA		
6	6-F	TGC GGT GAG CTG AGA TTA TG	376	52.0
	6-R	ACC CAC AAA CAA GAA AGG CA		
7	7-F	GCA GCT CTA ATG CTC AAG GG	465	54.0
	7-R	TGG TAC TGA ATG CTT CTG GAA A		
8	8-F	CCA TTC TGC AGT TTA ATG CTC A	512	52.2
	8-R	TAG AGA TGG GGT TTT GCC AC		
9	9-F	CTG GAA AGG TTT TCC GGT TT	577	52.2
	9-R	TGC TTT GAA ACA TGC ACT ACG ATG		
10	10-F	GTC AAG GGC AGA TGA GTG GT	511	56.4
	10-R	TTC TAT GCT GGA AAC CAG GG		
11	11-F	TTG TCT TTT TCC TCT TGC CC	362	56.4
	11-R	AGC GAA TGT GAA GCA CAG GT		
12	12-F	CCT GTT GCT TAT CAT TTC TCA CC	391	54.0
	12-R	AGA GTG AGA CCC TGC CTC AA		
13	13-F	CAG CCT CCC AAA GTG ATA GG	341	56.8
	13-R	ATG GCT AAA AGA AGG CAG CA		
14	14-F	AGG GAC GGG CAA TAG GAT AG	404	56.8
	14-R	CAT TGC TTA CAA TTA GGT CTT TTT GA		

表 2 APC 基因 15 号外显子 PCR 引物  
Tab 2 PCR primers for 15 exon of APC gene

Segment	Primers	Sequences(5'-3')	Size(bp)	Annealing(°C)
A	1-F	AGA GTG GCA CCC AAC CAT AG	526	59.0
	1-R	TCC CAT AAT GCT TCC TGG TC		
B	2-F	CAG GCA AAT CCT AAG AGA GAA CA	558	59.0
	2-R	CTT GAT GAA GAG GAG CTG GG		
C	3-F	GCT CAA GCT TGC CAT CTC TT	552	59.0
	3-R	TAT GGG CAG CAG AGC TTC TT		
D	4-F	CCA GGA ACT TCT TCA AAG CG	521	59.0
	4-R	GTG AAG GAC TTT GCC TTC CA		
E	5-F	GTC AAT ACC CAG CCG ACC TA	536	59.0
	5-R	AGG CTG ATC CAC ATG ACG TT		
F	6-F	TTC CAA CCA CAT TTT GGA CA	429	59.0
	6-R	GAG CTG ATT CTG CCT CTT GG		
G	7-F	AAC GTC ATG TGG ATC AGC CT	498	59.0
	7-R	TGC TGG ATT TGG TTC TAG GG		
H	8-F	CAG ACG ACA CAG GAA GCA GA	542	59.0
	8-R	GCA GCT TGC TTA GGT CCA CT		
I	9-F	GTG AAC CAT GCA GTG GAA TG	536	59.0
	9-R	TGT TGG CAT GGC AGA AAT AA		
J	10-F	TTT GCC ACG GAA AGT ACT CC	442	56.8
	10-R	TAT CAT CCC CCG GTG TAA AA		

(接下表)

(续前表)

Segment	Primers	Sequences(5'-3')	Size(bp)	Annealing(°C)
K	11-F	CTG TGG CAA GGA AAC CAA GT	481	56.8
	11-R	TGA TTT TTG TTG GGT GCA GA		
L	12-F	CCC AAA GGG AAA AGT CAC AA	524	56.8
	12-R	GCT GAT TGT TGG TTG GAG GT		
M	13-F	TCA CCT CAT CAT TAC ACG CC	473	56.8
	13-R	GGT TCT CCC TGT GAG TCA GG		
N	14-F	ACT CCG GTT TGC TTT TCT CA	489	56.8
	14-R	AGC AGC AGC AGC TTG ATG TA		
O	15-F	GCC TTC AAG ACT CAA GGG TG	533	56.8
	15-R	TTG TCC TGC CTC GAG AGA TT		
P	16-F	GCT GCT GCT GCA TGT TTA TC	505	56.8
	16-R	TGG CAA CAG GGC TTA ATT CT		
Q	17-F	AAT CTC TCG AGG CAG GAC AA	532	56.8
	17-R	TCC TTT GGA GGC AGA CTC AC		
R	18-F	CAG GTT TAT CCA AGA ATG CCA	458	52.0
	18-R	TTC AGA ATG AGA CCG TGC AA		
S	19-F	CCC ACC TAA TCT CAG TCC CA	530	52.0
	19-R	CAA TCA CCG GGG GAG TAT TA		
T	20-F	AAA TGG CAC CTG CTG TTT CT	546	52.0
	20-R	TTC CAC TGG ATT CTG TGC TG		
U	21-F	TTG GAA AAT CGC CTG AAC TC	524	52.0
	21-R	TGG CTT CCA GAA CAA AAA CC		

表 3 3例 APC 基因突变的 FAP 患者突变位点

Tab 3 Mutation sites of APC gene in 3 patients

Patients' No.	Site	Codon	Mutation of nucleotide	Type	Consequence
1	15 exon	1 509	G-A	Missense mutation	Arginine-Glutamine
2	15 exon	1 509	G-A	Missense mutation	Arginine-Glutamine
6	14 intron	-139	AGAA	Insert mutation	Not clear

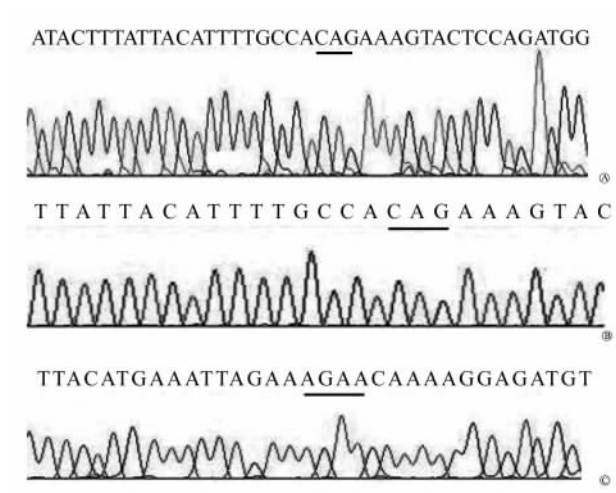


图 1 3例 APC 基因突变的 FAP 患者 PCR 测序图

Fig 1 PCR sequencing map of 3 FAP patients with APC gene mutation

A; F1; B; F2. In these 2 patients, 1 509 codon has mutation (CGG mutated into CAG, leading a change from Arginine to Glutamine; C: F6, 14 intron has mutation (AGAA was inserted to 2 249-2 252 codon)

### 3 讨论

大肠癌是一种遗传倾向比较明显的恶性肿瘤,最为突出的有两种:FAP 和遗传性非息肉病性大肠癌(HNPCC)。近年来在结直肠肿瘤分子遗传学研究中取得的进展首先就是通过对 FAP 的研究突破的,尤其是 1991 年 APC 基因的成功克隆<sup>[2]</sup>。该基因定位于人染色体 5q21-22。包含 8 538 个核苷酸组成的开放阅读框架,共含 15 个外显子,编码 2 843 个氨基酸。作为 Wnt 通路的重要分子,参与细胞黏附、生长、增殖等过程。其突变在结直肠癌等肿瘤发生发展中起重要作用。一旦发现突变基因携带者,可及时进行监测,以预防大肠癌和发现并治疗早期癌。而非突变基因携带者则可免除不必要的定期筛查,从而达到减轻患者及家属经济负担和减轻患者痛苦的目的。

DHPLC 是近年来才发展起来的一项新的分析技术,具有自动化程度高、敏感和经济的特点。本研究

利用 PCR-DHPLC 技术对我国 6 例 FAP 患者进行 APC 基因 1-15 号外显子和部分非编码区进行突变检测的研究,3 例发现突变,突变检出率 50%,与台湾地区报道<sup>[1]</sup>一致,而低于欧洲国家的报道<sup>[3]</sup>。这提示 APC 基因突变可能存在种族差异性。

本组中 1、2 号患者均在 1 509 号密码子发生突变,导致精氨酸密码子 CGG 转变为谷氨酰胺密码子 CAG。但 2 例患者有不同的表现型,并且,2 号家系其他 FAP 患者无 1 例发生甲状腺癌。国外文献也报道了同一家系内患者临床表现有很大差异,不同家系发现相同的突变类型,但临床表现不同,不同的基因突变却又可以有大致相同的临床表现,这些现象可能与其他修饰基因的调节、环境因素的作用有关<sup>[4,5]</sup>。

最近,有学者报道了 FAP 患者发生在内含子的基因突变病例,导致转录时剪接位点发生变化,并且,剪接区域上游的碱基序列变化也会影响剪接的精确性<sup>[6]</sup>。本组 6 号病例 14 号内含子发生 4 个碱基插入突变,我们推测该突变可能会影响剪接的精确性。

本研究结果初步提示中国人 FAP 患者 APC 基因突变情况,由于中国人 FAP 患者 APC 基因突变的研究鲜见报告,目前对其病理生理意义知之甚少,亟需开展广泛而深入的研究。APC 基因突变检测阴性家系患者其遗传学基础可能在于调控序列、内含子的突变、影响蛋白活性但不改变蛋白大小的突变及蛋白修饰相关基因的突变等。此外近年来研究发现,除 APC 外,其他一些基因可能与散发 FAP 有关。Sampson 等<sup>[7]</sup>报道在一组未检测出 APC 基因突变的患者中,MYH 基因突变检出率为 25%。Ti-

ziana 等<sup>[8]</sup>报道一组 AFAP 患者其携带者高达 60%,他们提出,对于大肠息肉大于 30 枚且没有遗传家族史的 AFAP 患者应进行 MYH 基因突变检测。因此,对 APC 基因突变阴性的中国人 FAP 患者相关候选基因和修饰基因有待进一步研究。

## [参 考 文 献]

- [1] Wei SC, Su YN, Tsai-Wu JJ, et al. Genetic analysis of the APC gene in Taiwanese familial adenomatous polyposis[J]. J Biomed Sci, 2004, 11:260-265.
- [2] Groden J, Thliveris A, Samowitz W, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene [J]. Cell, 1991, 66:589-600.
- [3] Heinimann K, Mullhaupt B, Weber W, et al. Phenotypic differences in familial adenomatous polyposis based on APC gene mutation status[J]. Gut, 1998, 43:675-679.
- [4] Rozen P, Samuel Z, Shomrat Z, et al. Notable intrafamilial phenotypic variability in a kindred with familial adenomatous polyposis and an APC mutation in exon 9[J]. Gut, 1999, 45:829-833.
- [5] Crabtree MD, Tomlinson IP, Hodgson SV, et al. Explaining variation in familial adenomatous polyposis: relationship between genotype and phenotype and evidence for modifier genes[J]. Gut, 2002, 51:420-423.
- [6] Neklason DW, Solomon CH, Dalton AL, et al. Intron 4 mutation in APC gene results in splice defect and attenuated FAP phenotype[J]. Fam Cancer, 2004, 3:35-40.
- [7] Sampson JR, Dolwani S, Jones S, et al. Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutation of MYH[J]. Lancet, 2003, 362:39-41.
- [8] Tiziana V, Sara M, Francesca C, et al. High frequency of MYH gene mutations in a subset of patients with familial adenomatous polyposis[J]. Gastroenterology, 2004, 126:1681-1685.

[收稿日期] 2005-08-15

[修回日期] 2005-12-30

[本文编辑] 曹 静

## Bioactive asterosaponins from the starfish *Calcita novaeguineae*

Tang HF, Yi YH, Li L, Sun P, Zhang SQ, Zhao YP (Research Center for Marine Drugs, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] Two new sulfated steroidal pentaglycosides (asterosaponins), novaeguinosides I (2) and II (3), along with the known regularoside B (1) were isolated from the starfish *Calcita novaeguineae*. Their structures were elucidated by extensive NMR techniques as well as chemical evidence. The new asterosaponins showed marginal *in vitro* cytotoxicity against two human tumor cell lines.

[J Nat Prod, 2005, 68: 337-341]