

前列腺癌患者抑癌基因 PTEN 上游序列的突变分析

周 武 徐琦煜 陈占国 钱菁菁 沈 默 胡王强

摘 要 **目的** 查找前列腺癌患者抑癌基因(phosphatase and tensin homologue deleted chromosome, PTEN)上游序列是否存在改变,以及该改变与前列腺癌发生发展是否存在关联。**方法** 提取 50 例前列腺癌(prostate cancer, PCa)及 30 例正常对照组的外周血 DNA,扩增 PTEN 外显子 1 上游 1200bp 左右 DNA 片段,纯化目的产物后进行测序,观察 PCa 患者与对照组的差异。**结果** PCa 患者在 PTEN 基因外显子 1 上游 -510bp 处存在 G/A 变异,形成 3 种基因型 GG、GA、AA。前列腺癌与对照组相比,3 种基因型频率存在差异($\chi^2 = 7.78, P < 0.05$)。**结论** 作为抑癌基因的上游序列,基因的突变有可能导致了 PTEN 基因转录能力的下降,进而降低了抑癌基因对前列腺癌变进展的抑制作用。

关键词 前列腺癌 抑癌基因 PTEN 突变

Relevance of the Polymorphism in Upstream Sequence of PTEN Gene with Prostate Cancer. Zhou Wu, Xu Qiyu, Chen Zhanguo, Qian Jingjing, Shen Mo, Hu Wangqiang. Department of Medical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To elucidate the relevance of the polymorphism in upstream sequence of PTEN gene with prostate cancer. **Methods** We amplified the DNA fragments upstream 1200bp of the PTEN exon 1, and analysed the sequence between the PCa patients and the controls. **Results** An A/G mutation upstream -510bp of PTEN gene was found, and the AA genotype was more in prostate cancer than in healthy controls. **Conclusion** The A/G mutation upstream -510bp of PTEN gene may reduce the expression of PTEN and promote the development of the prostate cancer.

Key words Prostate cancer; PTEN; Mutation

前列腺癌在美国男性恶性肿瘤的发病率中占第 1 位,是一种老年人多发的恶性肿瘤,病死率仅次于肺癌。我国是前列腺癌低发地区,但近年来随着人们生活水平的提高,人口结构的老龄化、饮食结构的改变,加上男性激素使用不当,其发病率呈上升趋势^[1]。由于前列腺癌是一种复杂的疾病过程,涉及遗传学、内分泌和其他渐变因素,其发病机制至今仍不十分清楚^[2~4]。PTEN 基因称为第 10 号染色体同源丢失性磷酸酶—张力蛋白基因,是一种肿瘤抑制基因,位于 10q23,1997 年 Jing Li 等发现在恶性胶质瘤(5/8)乳癌(2/20)前列腺癌(4/4)中该基因存在大量的缺失及移码突变。后期的研究发现,前列腺癌患者 PTEN 蛋白表达明显降低^[5~7]。

鉴于以往的研究大都针对肿瘤患者 PTEN 表达的减少或基因的缺失和突变,很少涉及该基因表达的改变是否与其自身的调控基因改变有关,而作为基因

调控序列之一的启动序列大多在外显子上游某区域,故本研究尝试在前列腺癌患者的 PTEN 外显子上游 1200bp 左右进行 DNA 片段的序列分析,查找是否存在 DNA 序列的改变,并探讨该改变是否与前列腺癌的发生发展有关^[8~10]。现报告如下:

材料与方法

1. 对象:以 2008~2009 年来温州医学院附属第一医院泌尿外科病例为研究对象,所有患者均经前列腺穿刺病理检查确诊为前列腺癌。前列腺癌组 50 例,患者年龄 43~86 岁,平均年龄 69.42 ± 10.29 岁,病理活检 Gleason 评分 8 分 24 例,9 分 13 例,10 分 13 例;以同期来院体检的 30 例健康体检者为对照组,年龄 46~83 岁,平均年龄 65.38 ± 11.47 岁,对照组经 B 超、前列腺特异性抗原检查,并询问病史,排除前列腺增生及前列腺癌疾病。所有受试对象均知情同意,本研究经医院医学伦理委员会同意批准。

2. 检测试剂:血液标本的总 DNA 提取采用大连宝生物工程有限公司经典总 DNA 抽提试剂盒, GeneRuler 1kb DNA、PCR 扩增试剂、Taq 酶购自 Fermentas 公司, GoldView 染料购自 SBS(赛百盛)公司,胶回收试剂盒购自大连宝生物工程有限公司。

3. 检测方法:(1)血液标本的总 DNA 提取:取患者静脉血

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(Y2110662);温州市科技局科研基金资助项目(Y20090292)

作者单位:325000 温州医学院附属第一医院实验诊断中心

通讯作者:周武,电子邮箱:gonewithwind95@163.com

2ml 用 EDTA - Na2 抗凝,按大连宝生物工程有限公司经典总 DNA 抽提试剂盒说明提取 DNA。(2)引物设计:由于扩增的目的片段较长,且富含 GC 碱基,为获得特异且足量的产物,除反应体系优化外,设计内外引物进行巢式 PCR。查找 PubMed Genbank,根据 PTEN DNA 全序列 (gi:89161187) 采用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,引物序列经 Blast 同源比较分析,外引物:上游 P1: 5' - CAggCagCTACACTgggCATg - 3', 下游 P2: 5' - gCAATCggTggCTTgACACTT - 3', 内引物:上游 P1: 5' - ggCagCTACACTgggCATg - 3', 下游 P2: 5' - gCCg-CagAAATggATACAgg - 3', 由上海基康生物有限公司合成。(3)PTEN 外显子 1 上游 1200bp 目的 DNA 片段的扩增:50μl 反应体系,其中 25μmol/L Mg²⁺ 3μl, 10 × Buffer 5μl, 0.2μmol/L 上下游引物各 2μl,0.2μmol/L d NTP 5μmol,5U/μl Taq 0.4U, H₂O 31.6ml, 5μmol/L 二甲亚砜 4μl,5μmol/L 甘油 4μl。扩增反应参数:94℃ 2min;94℃ 20s,68℃ 20s,72℃ 1min,35 个循环;72℃ 10min。(4)目的片段的纯化回收:扩增产物与 1kb Mark 一起以 2% 琼脂糖凝胶、110V 电压电泳 30min,GoldView 染料标记,在紫外线下 1200bp 处出现的电泳条带为目的条带,采用大连宝生物工程有限公司提供的胶回收试剂盒按说明书操作纯化回收目的片段。(5)PTEN 外显 1 上游 1200bp 目的 DNA 片段的测序:纯化后的目的片段送上海 Invitrogen 生物技术有限公司测序,所有标本均经正反测序验证结果一致性。

4. 统计学方法:采用统计分析软件包 SPSS 13.0 进行数据管理和分析,两组基因型频数分布的 Hardy - Weinberg (H - W)平衡检验应用拟和优度 χ^2 检验;两组 SNP 位点等位基因型的频数分布差异比较采用 χ^2 检验;相对风险以 OR 表示,采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

结 果

1. 基因多态性:对 50 例前列腺癌患者和 30 例正常对照组的外周血 DNA 标本扩增 PTEN 外显子 1 上游 1200bp 目的片段后,测序结果显示在 PTEN 外

显子 1 上游 - 510bp 处存在 G/A 突变(图 1)。50 例前列腺癌患者中检测出 25 例(50%)杂合突变,14 例(28%)纯合突变。30 例正常对照组中检测出 12 例(40%)杂合突变,3 例(10%)纯合突变。

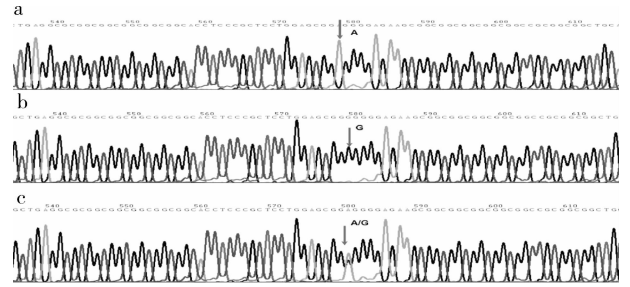


图 1 PTEN 基因外显子 1 上游 - 510bp 处单核苷酸多态性

2. H - W 平衡检验:拟合优度 χ^2 检验结果表明,PTEN 基因上游突变位点的基因型分布在病例组和对照组均符合 Hardy - Weinberg 平衡定律 ($P > 0.05$),因而此基因库适合遗传分析(表 1)。

表 1 病例组和对照组 PTEN 基因上游突变位点基因型频数分布的拟合优度 χ^2 检验

组别	GG	GA	AA	χ^2	P
病例组	11	25	14	0.0007	>0.05
对照组	15	12	3	0.0680	>0.05

3. PTEN 基因上游突变位点等位基因和基因型的频数分布:前列腺癌患者组和正常对照组在 PTEN 外显子 1 上游 - 510bp 单核苷酸多态性位点的等位基因型频数分布比较,差异有显著性($\chi^2 = 7.78, P < 0.05$),当 GG 基因型变为 AA 型后,患者发生前列腺癌的风险增加 6.36 倍(95% CI:1.46 ~ 27.67)(表 2)。

表 2 病例组与对照组 PTEN 基因外显子 1 上游 - 510bp 位点等位基因和基因型的频数分布 [n(%)]

组别	基因型频率			等位基因频率		χ^2 *	OR**	95% CI**
	GG	GA	AA	G	A			
病例组	11(22.0)	25(50.0)	14(28.0)	47(47.0)	53(53.0)	7.78	6.36	1.46 ~ 27.67
对照组	15(50.0)	12(40.0)	3(10.0)	42(70.0)	18(30.0)			

* 病例组与对照组 PTEN 基因外显 1 上游 - 510bp 位点等位基因型频率比较, $P < 0.05$; ** 与 GG 基因型相比,AA 基因型患前列腺癌的相对风险, $P < 0.01$

讨 论

癌基因的激活和(或)抑癌基因的失活是各种肿瘤发生、发展的基础。在肿瘤进展中,抑癌基因常因突变和缺失改变了其生物学特性而失活。近几年来,许多研究表明人类多种肿瘤的发生、发展与染色体 10q 23 及其附近的片段缺失有密切关系,提示染色

体 10q 23 及其附近可能存在抑癌基因。1997 年,不同的研究者应用不同的方法,发现了在 10q 23 染色体上存在一种肿瘤抑制基因,被命名为 PTEN 或 MMAC1 或 TEP1 基因^[11~13]。

国内外研究表明 PTEN 基因失活主要表现为癌症患者 PTEN 蛋白表达的显著下降,但对于 PTEN 表

达下降的原因却研究甚少。一般来说,基因表达下降的原因可以有:①基因在 DNA 结构上的改变,进而影响蛋白结构的完整性和表达;②基因对应的调控序列(启动子、增强子、弱化子等)发生改变,引起蛋白表达改变;③ mRNA 的转录过程改变;④ miRNA 与靶 mRNA 的互补配对而在转录后水平上对基因的表达进行负调控。Whang 等^[14]对 10 例晚期前列腺癌进行研究,发现 1 例存在 PTEN 基因的纯合性缺失,5 例存在在 mRNA 或蛋白水平上 PTEN 基因表达的减少或缺失,提示 PTEN 的失活可能发生在转录水平,并对晚期前列腺癌的进展有影响。

本次实验选取的 PTEN 外显子 1 上游 1200bp DNA 区段进行分析,旨在研究前列腺癌的发生中抑癌基因 PTEN 表达的减少是否与其上游序列的突变有关。鉴于扩增区域富含 GC 碱基,普通扩增难以获得单一条带的特异性扩增产物,反应体系中添加了二甲亚砜和甘油,在优化反应参数后成功扩增出目的 DNA 片段。

实验结果表明,前列腺癌患者的 PTEN 基因外显子 1 序列上游 -510bp 处存在 G/A 突变,50 例前列腺癌中,有 39 例存在纯合(25/50)或杂合(14/50)突变,与正常对照组的突变构成比相比,差异存在显著性($\chi^2 = 7.78, P < 0.05$),提示该基因的突变与前列腺癌的发生有关,但并不一定是该突变诱发了前列腺癌变的发生。作为抑癌基因的启动上游,该突变更有可能导致了 PTEN 基因转录能力的下降,进而降低了对前列腺癌变进展的抑制作用。但基于样本数量的限制和实验初期选择的大多是高度病变(Gleason 评分 ≥ 8 分)的病例,本次实验未能对该基因位点的突变与前列腺癌的 Gleason 评分间的关系进行进一步研究。从实验结果来看,当 PTEN 基因外显子 1 序列上游 -510bp 处的 G 突变为 A 后,相对于正常对照组,该突变使患癌的风险增加了 6.36 倍(OR = 6.36, 95% CI: 1.46 ~ 27.67, $P < 0.01$)。

在本次实验中,我们扩增出 PTEN 外显子 1 上游 1200bp 富含 GC 的 DNA 片段。经测序分析发现在 PTEN 外显子 1 上游 -510bp 存在着 G/A 突变,相对于正常人群,该突变在前列腺癌患者中较多见,可能与该突变影响力 PTEN 基因的表达,降低了 PTEN 作为抑癌基因对前列腺癌变进展的抑制作用有关。

参考文献

- 1 孙颖浩. 我国前列腺癌的研究现状[J]. 中华泌尿外科杂志, 2004, 25(2): 77-80
- 2 Jain S, Bhojwani AG, Mellon JK. Improving the utility of prostate specific antigen (PSA) in the diagnosis of prostate cancer: the use of PSA derivatives and novel markers[J]. Postgrad Med J, 2002, 78: 646-650
- 3 Gao CL, Rawal SK, Sun L, *et al.* Diagnostic potential of prostate - specific antigen expressing epithelial cells in blood of prostate cancer patients[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9: 2545-2550
- 4 Punglia RS, D'Amico AV, Catalona WJ, *et al.* Effect of verification bias on screening for prostate cancer by measurement of prostate - specific antigen[J]. N Engl J Med, 2003, 349: 335-342
- 5 蒋宏毅, 赵晓昆, 钟朝晖, 等. PTEN/MMAC1/TEP1/TGF- β 1 在前列腺癌及前列腺增生中的表达及其意义[J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18(9): 1221-1225
- 6 杨光华, 白铁男, 胡海龙, 等. PTEN 和 p38MAPK 在前列腺良恶性病变中的表达及意义[J]. 天津医药, 2010, 38(12): 1035-1038
- 7 李树平, 谭常兰, 姚利萍, 等. 前列腺干细胞抗原和 PTEN 蛋白在前列腺癌组织中的表达及其相关性[J]. 中华男科学杂志, 2008, 14(3): 272-274
- 8 Cairns P, Okami K, Halachmi S, *et al.* Frequent inactivation of PTEN/MMAC1 in primary prostate cancer[J]. Cancer Res, 1997, 57: 4997-5000
- 9 Suzuki H, Freije D, Nusskern DR, *et al.* Interfocal heterogeneity of PTEN/MMAC1 gene alterations in multiple metastatic prostate cancer tissues[J]. Cancer Res, 1998, 58(2): 204-209
- 10 Wang SI, Panson R, Ittmann M. Homozygous deletion of the PTEN tumor suppressor gene in a subset of prostate adenocarcinomas[J]. Clin Cancer Res, 1998, 4(3): 811-815
- 11 Li J, Yen C, Liaw D, *et al.* PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer [J]. Science, 1997, 275(5308): 1943-1947
- 12 Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, *et al.* Identification of a candidate tumor suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers [J]. Nat Genet, 1997, 15(4): 356-362
- 13 Li DM, Sun H. TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta[J]. Cancer Res, 1997, 57(11): 2124-2129
- 14 Whang YE, Wu X, Suzuki H, *et al.* Inactivation of the tumor suppressor PTEN/MMAC1 in advanced human prostate cancer through loss of expression [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(9): 5246-5250

(收稿: 2011-03-09)

(修回: 2011-03-16)