

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2011.02.007

家族性乳腺癌患者 BRCA1 基因序列突变分析*

孔灵玲 崔文[△] 王旭 姜小刚 张国安

(济宁医学院基础医学与法医学院, 山东 济宁 272067)

摘要 目的 研究山东济宁地区家族性乳腺癌(familiar breast cancer, FBC)患者 BRCA1 基因的突变情况。方法 选取山东济宁地区 8 个乳腺癌家系中各 1 例乳腺癌患者, 10 例乳腺导管内乳头状瘤病例为对照。应用 PCR 技术和 DNA 直接测序技术检测 BRCA1 基因外显子 11 的突变。结果 实验组与对照组在外显子 11 的序列中均未发现突变。结论 BRCA1 突变在山东济宁地区家族性乳腺癌患者中突变率较低, 今后将扩大样本数量, 继续寻找突变热点。

关键词 BRCA1; 家族性乳腺癌; 突变

中图分类号: 737.9 **文献标志码**: A **文章编号**: 1000-9760(2011)04-096-03

Analysis of the mutations of BRCA1 in familial breast cancer patients

KONG Ling-ling, CUI Wen, WANG Xu, et al

(College of Basic and Forensic Medicine, Jining Medical University, Jining 272067, China)

Abstract: **Objective** To analyze the mutations of BRCA1 in familial breast cancer patients of Jining. **Methods** Peripheral blood samples were obtained from 8 patients enrolled from 8 breast cancer families and 10 breast intraductal papillomatosis as control group. The mutations of BRCA1 gene exon11 were screened by the Polymerase Chain Reaction (PCR) and DNA sequencing. **Results** The mutation was not found in exon11 among these 8 familial breast cancer patients and control group. **Conclusion** The mutation frequency of BRCA1 in familial breast cancer patients from Jining is obviously lower than the western country. It is important that further study be conducted to explore specific mutations of this gene or other possible relevant genes in Chinese familial breast cancer patients.

Key words: BRCA1; familial breast cancer; Mutation

乳腺癌易感基因(breast cancer susceptibility gene 1, BRCA1)^[1]是与家族遗传性乳腺癌和卵巢癌发生密切相关的抑癌基因, 大约 5%~10% 的乳腺癌患者表现出家族遗传性。在犹太人和白种人的研究中, 单纯乳腺癌家系中有 50% 以上与 BRCA1 突变有关, 而在乳腺癌和/或卵巢癌家系中 BRCA1 突变率更可高达 80% 以上。到目前为止, 已有超过 500 种的 BRCA1 突变被发现, 并且这些突变位点遍布 BRCA1 的整个编码区, 没有明确的“热点”。而我国对家族性乳腺癌与 BRCA1 关系的研究很少。为了了解中国家族性乳腺癌患者与 BRCA1 的关系, BRCA1 基因的突变特点以及可能具有的临床应用价值, 我们采用 PCR-SSCP

及直接 DNA 测序的方法分析研究了中国汉族 8 个家族性乳腺癌患者 BRCA1 的突变情况。

1 材料与方法

1.1 一般资料

收集济宁医学院附属医院及金乡县人民医院 1994 年 7 月至 2002 年 7 月间乳腺外科手术切除标本, 病理诊断明确的 10 例乳腺导管内乳头状瘤和 8 例家族性乳腺癌组织(其中浸润性导管癌 7 例, 髓样癌 1 例)。患者均为女性, 乳腺导管内乳头状瘤患者就诊时年龄为 23~62 岁, 中位年龄 39 岁; 乳腺癌患者就诊时年龄 23~45 岁, 中位年龄 32 岁。乳腺癌患者均有乳腺癌家族史, 其特征有: 父系或母系中至少有 2 个亲属患乳腺癌; 同时有乳腺癌和卵巢癌家族史; 有双侧发病和/或年轻时发病的家族史。所有病例均行乳腺癌根治性手术, 术

* 基金项目: 卫生部科学基金资助(编号: 961354)

[△][通信作者] 崔文, E-mail: cuiwenmd@163.com

前均未接受放疗、化疗及其他抗癌治疗。在知情同意的情况下,每位患者抽取外周静脉血 5ml,ACD 抗凝,直接提取 DNA 或置于 -70°C 冰箱备用。

1.2 DNA 提取

取淋巴细胞 2×10^6 个,加入 $500\mu\text{l}$ 含 10% SDS、100 mg/ml 蛋白酶 k 的细胞裂解液中, 37°C 水浴 16 h,然后加入等体积的 1:1 酚和氯仿混合液,震荡混匀后 12000r/min 离心 5 min,取上清加入 2.5 倍体积乙醇,放置 20 min。12000r/min 离心,去上清收集沉淀,沉淀用 $100\mu\text{l}$ 水溶解, -20°C 保存备用。

1.3 BRCA1 基因引物选择

根据文献^[2-3]设计 13 对引物用于扩增第 11 外显子,由上海申友生物技术有限公司合成。PCR 反应总体积 $50\mu\text{l}$,含 $0.5\mu\text{g}$ 模板 DNA, $0.4\mu\text{mol/L}$ 上、下游引物, $200\mu\text{mol/L}$ dNTPs, 2.0U Taq DNA 聚合酶和相应的缓冲液 (2.5mmol/L MgCl_2)。Taq DNA 聚合酶和相应的缓冲液均由 Promega 公司提供。PCR 参数为: 95°C 预变性 2min, 94°C 30S, 55°C 30S, 72°C 30S。32 个循环后, 72°C 延伸 5min, 4°C 保存。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后 -20°C 保存。

1.4 DNA 序列分析

将 PCR 扩增产物进行 DNA 测序,所得测序结果与 GenBank 中 BRCA1 cDNA(U14680)正常的基因序列进行对照,判断有无基因突变,最后将检测数据与乳腺癌信息中心网站数据库(BIC)对照,判断是否为致病性突变位点。

2 结果

2.1 PCR 扩增

本文 8 例家族性乳腺癌及 10 例乳腺导管内乳头状瘤病人 BRCA1 基因第 11 外显子的 PCR 扩增产物,其在 15g/L 琼脂糖凝胶中电泳检测均显示单一条带,与对照组的相应片段长度一致,表明 18 例病人 BRCA1 基因在所检测的片段上均没有明显的插入或缺失(见图 1)。

2.2 DNA 测序

对 PCR 扩增产物进行 DNA 直接测序,在外显子 11 的序列中未发现基因突变。

3 讨论

1990 年, Hall 等^[4]通过对 23 个家族的 146 个乳腺癌病例的研究发现,早发性家族遗传性乳腺癌的发生与染色体 17q21 的一个基因突变有关,此基因随后被命名为 BRCA1。MIKI 等^[1]利用定点

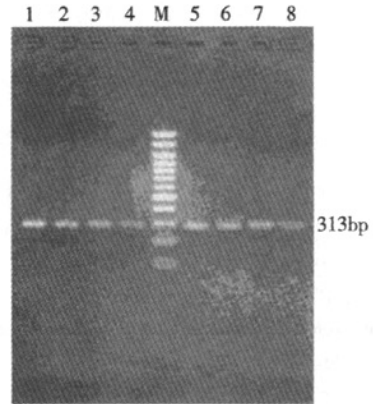


图 1:8 例家族性乳腺癌 PCR 结果
M: marker 1-8:8 例家族性乳腺癌标本

克隆技术发现 BRCA1 包括 24 个外显子和 22 个内含子,其中最大的外显子 11 长度约为 3.4 kb,占整个编码序列的 60%。BRCA1 的抑癌作用呈隐性存在的,当基因发生突变时所编码的蛋白质表现为功能降低或丧失,它的失活使细胞分化受阻,失去正常分化对增殖的作用,从而导致细胞恶变和肿瘤的发生^[5]。BRCA1 基因的突变可造成乳腺癌和卵巢癌易感性增高,作为遗传方式,以常染色体显性遗传的方式遗传给子代。

近 10 年来,一些学者对乳腺癌 BRCA1 基因的研究发现,多种形式的基因突变可发生于 BRCA1 基因的整个编码区,到目前为止已确定了 100 多种 BRCA1 的种系突变,包括错义突变、无意义突变、移码突变、缺失突变等,但未发现有普遍意义的突变热点。但是由于环境因素和遗传因素的差异,这两个基因在不同研究及人群中突变的分布以及各自所占比例的报道差异很大,瑞典、北欧犹太妇女中 BRCA1 的突变率较高^[6-7]。在亚洲人群中,有关 BRCA1 的研究结果显示,其突变率明显低于西方人群。我国的研究起步较晚,结果并不一致^[8-12],同时没有发现中国人群中的“始祖突变”。

本研究选择了 11 号外显子,是国外文献报道中 BRCA1 基因突变检出率最高的 1 个区域,具有一定的代表性。对 8 例有家族史的乳腺癌患者进行 BRCA1 基因检测,未发现突变,考虑可能是由于样本数量过少,加之中国人突变率较欧美人群为低所致。今后还将增加家族性乳腺癌的研究数量,寻找中国人 BRCA1 基因的突变特点,以进一步明确乳腺癌、卵巢癌与 BRCA1 基因突变的相关性,为早期诊断方法的建立及基因治疗开辟一个新领域。BRCA1 突变基因的种类繁多,且无固定“热

点”可循,这给检测工作带来了困难。最全面但也是最昂贵的方法是直接检测 BRCA1 基因外显子和内含子的序列。该方法被认为具有最高的敏感性和特异性。但该方法无法检测到整条外显子的缺失,所以有 15% 的 BRCA1 突变被漏掉了。其他基因检测方法的灵敏度都各不相同,目前较常应用的有多聚酶链反应-单链构象多态性法、变性梯度凝胶电泳法和结构敏感凝胶电泳法等。但各种方法都各有缺点,会造成一定的误差,这在基因检测时应引起注意。单链构象多态性(SSCP)分析法工作量较大,也不能检测到所有的突变,因此给临床应用带来不便。但对高危人群进行 BRCA1 突变检测,以便早期发现突变携带者,及时采取一些预防措施有一定意义。BRCA1 的进一步研究对阐明乳癌发病机制和临床上乳腺癌的防治都有重要意义。

参考文献:

- [1] Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1[J]. Science, 1994, 266(5182): 66-71.
- [2] Gross E, Arnold N, Pfeiffer K, et al. Identification of specific BRCA1 and BRCA2 variants by DHPLC[J]. Hum Mutat, 2000, 16: 345-353.
- [3] Arnold N, Gross E, Schwarz BU, et al. A highly sensitive, fast and economical technique for mutation analysis in hereditary breast and ovarian cancer[J]. Hum Mutat, 1999, 14(234): 333-339.
- [4] Hall JM, Lee MK, Newman B, et al. Linkage of early onset familial breast cancer to chromosome 17q21[J]. Science, 1990, 250: 1684-1689.
- [5] 李士谔. 细胞分化在致癌和抑癌中的作用[J]. 中国医学科学院学报, 1994, 16(1): 73-78.
- [6] Annika bergman, Anna flodin, Yvonne engwall, et al. A high frequency of germline BRCA1/2 mutations in western Sweden detected with complementary screening techniques[J]. Familial Cancer, 2005, 4(2): 89-96.
- [7] Struwing JP, Hartge P, Wacholder S, et al. The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews[J]. N E J Med, 1997, 336: 1401-1407.
- [8] 宋传贵, 胡震, 袁文涛, 等. 中国上海家族性乳腺癌 BRCA1 和 BRCA2 基因的突变[J]. 中华医学遗传学杂志, 2006, 23(1): 27-31.
- [9] 赖春宁, 江泽飞, 宋三泰, 等. 186 例乳腺癌患者 BRCA1 基因突变检测[J]. 中华肿瘤杂志, 2001, 23(6): 483-485.
- [10] 胡震, 李文凤, 柳晓义, 等. 中国乳腺癌患者 BRCA1 基因的频发突变 5589del18[J]. 中华医学遗传学杂志, 2007, 24(4): 378-381.
- [11] 曹明智, 马中良, 柳晓义, 等. 山东东部地区家族性和早发性乳腺癌 BRCA1 基因突变的研究[J]. 现代生物医学进展, 2009, 9(6): 1028-1031.
- [12] 饶南燕, 周婕, 赵林, 等. 219 例中国汉族遗传性乳腺癌患者 BRCA1 和 BRCA2 突变的研究. 中国癌症杂志, 2008, 18(5): 370-374.

(收稿日期 2011-02-27)

• 读者 • 作者 • 编者 •

作者书写参考文献须知

作者论文中引用的参考文献应为亲自阅读过的主要文章;按照文中首次出现的次序编写,在引文句末右上角用方括号注明,如^[1]、^[3-6]。论著的引用文献择其主要者,一般不超过 10 篇;综述不超过 25 篇。应引用公开发行的新的研究著作,勿引译文、文摘、转载、内部资料等。尽量不引用教科书。

引用参考文献的题录及外语拼写和著录符号容易出现错误,请按下列顺序及格式仔细核对,如有错误,将退回作者修正。格式如下:

1. 期刊文章

[序号] 作者姓名(3 位作者姓名,之间用逗号隔开;3 位作者以上者,只写前 3 位作者,后加“等”或“et al”)。题目[J]. 刊名(外文刊名缩写按 Index Medicus 格式)。年,卷(期):起页-止页。

2. 专著

[序号] 作者姓名. 书名[M]. 版次(第 1 版略)。出版地:出版社,出版年:起页-止页。

3. 专著中析出文献

[序号] 作者姓名. 题目[M]. 主编姓名. 书名. 版次. 出版地:出版社,出版年:起页-止页。

本刊编辑部