

人原发性乳腺癌及肺癌中乳腺癌抑制基因突变^①

王国丽^② 杜传书

(中山医科大学医学遗传学教研室, 广州, 510089)

提 要 采用 PCR-SSCP 方法,研究了 9 例人原发性乳腺癌和 20 例肺癌中 BRCA1 基因外显子 2 及外显子 21 区域上的突变情况。结果显示,3 例乳腺癌存在突变(3/9),其中 1 例发生于外显子 2,2 例发生在外显子 21 上,1 例肺癌在外显子 2 上发生突变(1/20,5%),该结果表明 BRCA1 基因突变与乳腺癌关系密切,同时该结果首次发现 BRCA1 基因突变可能与肺癌发生有关,但所有这些结果尚需进一步的序列分析证实。

主题词 乳腺肿瘤/遗传学; 肺肿瘤/遗传学; 基因,抑制; 肿瘤; 突变

中图分类号 R 730.231

从 70 年代的癌基因到 80 年代的抗癌基因研究,大量实验证实正常细胞的癌变是一个多因子、多步骤的复杂过程,正常基因的点突变、缺失、重排等改变,可能导致有关原癌基因的激活或抗癌基因的失活。目前为止,已有一些抗癌基因被分离、克隆。例如,最早发现的与视网膜母细胞瘤有关的 Rb 基因,与多种肿瘤有关的 p53 基因,以及与结肠癌有关的 DCC 基因等。最近,美国 Utah 州大学 Skolnick 小组^[1],分离到了与乳腺癌发生有关的抗癌基因 BRCA1,并报道了第一篇有关乳腺和卵巢癌中 BRCA1 基因突变研究的文章^[2]。作者从国外 BRCA1 基因研究现状和探讨它与其它肿瘤发生的关系出发,对人原发性乳腺癌和肺癌进行了以下突变研究。

1 材料和方法

1.1 标本

经病理确诊的 9 例人原发性乳腺癌、20 例人原发性肺癌及其癌旁正常组织取自本校

附一院和肿瘤医院。手术切除组织迅速置液氮中冷冻后 -70℃ 保存备用。2 例正常人外周血标本,4℃ 放置,1 h 内制备 DNA。

1.2 组织 DNA 制备

按常规组织 DNA 提取法制备^[3]。DNA 沉淀溶于 TE 中,取适量经紫外分光光度计测定 A₂₆₀、A₂₈₀,确定 DNA 的纯度及含量,其余样品放 -20℃ 贮存备用。

1.3 引物设计及扩增片段

根据 Skolnick 研究资料,合成 2 对寡聚核苷酸引物,长约 22~24 个碱基,分别扩增 BRCA1 基因外显子 2、外显子 21 全序列及内含子-外显子连结区域,扩增片段长度分别为 275 bp 和 300 bp。

1.4 扩 增

在 0.5 ml 离心管中,加入样品 DNA 0.1 μg, 10 × PCR 缓冲液 2.5 μl, 4 种 dNTP 各 200 μmol/L,扩增区域的一对引物各 20 pmol, TaqDNA 聚合酶 1.0 U,加灭菌 H₂O 至总体积 25 μl,混匀后离心,再加 20 μl 灭菌液体石蜡油覆盖,于热循环仪中 97℃ 7

① 广东省博士后科研基金资助; ② 第一作者,1966 年出生,女,博士后学者

min, 进行循环: 94 °C 30 s, 55 °C, 50 s, 72 °C, 60 s, 35 个循环后于 72 °C 延伸 7 min。取 PCR 产物 5 μl 经琼脂糖凝胶电泳鉴定, 其余放 -20 °C。

1.5 PCR 产物 SSCP 分析

取 PCR 产物 8 μl, 加等体积变性液 (φ 甲酰胺 = 95%, 20 mmol/L EDTA) 混匀后煮沸 5 min, 冰上聚冷 2 min, 上样非变性 PAG 凝胶, 0.5 × TBE 缓冲体系下, 80~90 V 室温电泳 18 h。电泳结束后凝胶按略加改进的 Brabdt^[4] 方法进行银染: φ(乙醇) = 10% 固定, 5 min → ω(HNO₃) = 1% 浸泡 3 min → 0.012 mol/L AgNO₃ 染色 20 min, 清水漂洗数次, 放入 0.28 mol/L Na₂CO₃ 和 ω(甲醛) = 0.019% 中显带数分钟, 最后用 φ(HAc) = 10% 固定 2 min, 用清水漂洗数次, 制干胶并拍照。

2 结 果

PCR-SSCP 技术是采用中性 PAG 电泳分离变性 DNA (PCR 产物) 的单链 DNA, 利用单碱基突变可引起单链构象改变影响电泳迁移率, 从而通过与正常对照比较单链带的位置及数量的差异来检测突变。由于各单链可能有几种稳定的构象体, 因此 SSCP 分析经常并非两条带。本实验应用 PCR-SSCP 技术, 以部分肿瘤癌旁正常组织及正常人外周血 DNA 为对照, 对病理确诊的 9 例原发性乳腺癌、20 例原发性肺癌组织 DNA 中乳腺癌基因 BRCA1 的外显子 2、外显子 21 分别进行了分析, 结果显示: 9 例乳腺癌中 3 例 BRCA1 基因 SSCP 分析存在异常, 其中 1 例 (BC3) 发生在外显子 2 上 (图 1), 另 2 例 (BC2、BC7) 发生在外显子 21 上 (图 2); 20 例肺癌中观察到 1 例鳞癌 I 级 (LC7) 在外显子 2 上, SSCP 结果出现异常 (图 1)。

1	2	3	4	5	6	7
T	N	T	N	T	T	N



图 1 BRCA1 基因外显子 2 PCR-SSCP 电泳

1, 2, 3, 4 肿瘤及其癌旁组织标本; 5 肿瘤组织标本 (LC7); 6 乳腺癌标本 (BC3); 7 正常人外周血标本; 箭头 → 指示突变样品缺少的单链带

1	2	3	4	5	6	7
T	N	T	T	N	T	T



图 2 BRCA1 基因外显子 21 PCR-SSCP 电泳

1 乳腺癌标本 (BC2); 2, 5; 正常人外周血标本; 3, 6; 乳腺癌标本; 4 乳腺癌标本 (BC2); 7 乳腺癌标本 (BC7); 箭头 → 指示突变样品缺少的单链带

3 讨 论

BRCA1 基因最早是由 King^[5] 等通过遗传连锁分析在人染色体 17 q12-21 区域上定位的一个乳腺癌相关基因, 近年才被克隆。该基因长 100 kb, 含有 22 个可编码外显子, 在包括乳腺、卵巢等许多组织中表达 7.8 kb 的转录体和 1 863 个氨基酸的蛋白质。该蛋白 N 末端区域含有一个 C₃H₄ 锌指结构域, 而在其它区域特别是 C 末端则含酸性残基, 提示该蛋白可能是一种转录因子^[6]。研究发现 30% 的乳腺癌家庭或 80% 既有乳腺癌又有宫颈癌患者家庭的发病与 BRCA1 基因突

变有关^[7]。如果一个妇女遗传了异常的 BRCA1 基因,患乳腺癌的可能性约为 90%,而 50 岁以前可能性为 60%^[8]。Skolnick 等采用 SSCP 结合测序分析 21 例乳腺癌和 12 例卵巢癌 BRCA1 基因的全部编码区和内含子—外显子结合区的全序列,结果发现 4 个突变,3 个发生在乳腺癌,1 个发生在卵巢癌^[9]。这些结果支持了 BRCA1 可能是一种与乳腺癌、卵巢癌有关的抗癌基因假说。因而 BRCA1 基因的研究将对乳腺癌的早期预防、诊断以及基因治疗具有重要意义。

本文是作者引用 Skolnick 的 SSCP 分析引物,国内首次报道原发性乳腺癌、肺癌中 BRCA1 第 2、21 外显子突变情况,结果发现有 33.3% 的乳腺癌存在异常,其突变的位置尚需进一步的序列分析来确定;同时发现 1 例肺癌的 BRCA1 基因外显子 2 上存在异常,暗示 BRCA1 基因可能不仅与乳腺、卵巢癌有关,可能还与肺癌等其它肿瘤发生有关。BRCA1 基因是否与 p53 基因相似,也是一种与多种肿瘤发生有关的抗癌基因,目前,国外尚未见其它肿瘤中 BRCA1 基因突变研究报道,这些还需进一步研究证实。

参 考 文 献

- 1 Nowak R. Breast cancer gene offers surprises. (1995-09-22 收稿 1996-03-10 修回)
- 2 Andrew FP, Liu QY, Shattuck—Eidens D, *et al.* BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science*, 1994, 266 : 120
- 3 吴冠芸,方福德. 基因诊断技术及应用. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1992. 179
- 4 Brandt B, Greger V, Yandell D, *et al.* A simple and nonradioactive method for detection the Rb 1.20 DNA polymorphism in the retinoblastoma gene. *Am J Hum Genet*, 1992, 51 : 1450
- 5 Hall JM, Lee MK, Newman B, *et al.* Linkage of early—onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science*, 1990, 250 : 1684
- 6 Ponder B. Searches begin and end. *Nature*, 1994, 371 : 279
- 7 Easton DF, Bishop DT, Ford D, *et al.* Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. *Am J Hum Genet*, 1993, 52 : 678
- 8 Ford D, Easton DF, Bishop DT, *et al.* Risks of cancer in BRCA1—mutation carriers breast cancer. *Lancet*, 1994, 343 : 692
- 9 Miki Y, Swensen J, Shattuck—Eidens D, *et al.* A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*, 1994, 266 : 66

MUTATIONS IN BREAST CANCER GENE 1 IN HUMAN PRIMARY BREAST CANCER AND LUNG CANCER

Wang Guoli Du chuanshu

(Department of Medical Genetics, Sun Yat-sen University of
Medical Sciences, Guangzhou, 510089)

Breast cancer gene 1 (BRCA1) is a breast cancer suppressor gene which was recently cloned and sequenced by Skolnick team. This group also reported BRCA1 mutations in primary breast and ovarian carcinoma. In this article, PCR—single strand conformation polymorphism analysis was performed on 9 cases of human primary breast cancer, 20 cases of

lung cancer and their adjacent normal tissue, in an attempt to detect mutations within BRCA1 gene exon 2 and exon 21. Mutations were found in 3 cases of breast cancer, 1 in exon 2 and 2 in exon 21. Among 20 cases of lung cancers mutation was also observed in exon 2 in 1 case. The results suggested that the BRCA1 gene mutation is an important event in primary breast cancers. Meanwhile, it also implies that the BRCA1 gene may be related to lung cancer. But all the results must be further proved by DNA sequencing.

Subject headings breast neoplasms/genetics; lung neoplasms/genetics; genes, suppressor, tumor; mutation

· 新成果 ·

衰老脑的可塑性研究

课题负责人 姚志彬

(中山医科大学人体解剖学教研室, 广州, 510089)

以往研究脑衰老多数从脑细胞的退化和机能减退方面进行,本课题则从发掘衰老脑的代偿机制和积极因素着手,系统地研究了老年脑的神经元树突,突触的结构和机能的可塑性变化及损伤后的修复与可塑性代偿。主要包括:酒精磷钨酸负染色和 OsO₄ 染色电镜结合体视学分析显示衰老脑海马和蓝斑的突触数量(N_v)、接触带总面积(S_v)、线粒体减少,但突触平均长度增大。指出设法增加突触结构的可塑性,提高突触的更新和代偿能力。Golgi 镀银和 CT-HRP 标记,结合形态计量和 Sholl 点分析表明,海马锥体细胞树突的分枝长度衰老时有所增加,脊髓前角神经元的树突分枝和长度衰老时减少,表明衰老时海马神经元树突仍具有一定的增生和分化能力。放射化学分析发现衰老脑的分离突触体 3H-氨基酸摄取能力减少,AVP4~9 肽能够促进其氨基酸摄取和蛋白合成。发现老年脑隔-海马胆碱能系统损伤后能对外源性神经生长因子(NGF)作出有效的可塑性反应。发现长期适量运动,使脊髓神经元的树突野扩大,分支数的树突总长度明显增加,大脑皮质胆碱能纤维的密度增加,表明长期适量运动能够延缓神经元的衰老性退变,促进其可塑性代偿。该成果对临床治疗老年性痴呆提供了实验依据,将会给社会和老年医学带来良好的影响。1994 年获国家教委科技进步二等奖。

(陈丽芳)