

• 基础实验研究论著 •

散发性结直肠癌患者 hMSH2 基因 mRNA 外显子 13 缺失及 IVS12(-6)T>C 多态性分析

王小英¹, 周代锋², 陈 勇³, 孟 津³, 蔡望伟^{2△}

(1. 海南医学院生物技术专业实验室, 海南海口 571199; 2. 海南医学院生物化学教研室, 海南海口 571199; 3. 海南医学院附属医院肿瘤外科, 海南海口 570102)

摘要:目的 分析人外周血白细胞 hMSH2 基因 mRNA 外显子 13 缺失及 hMSH2 基因 ISV12(-6)T>C 多态性与散发性结直肠癌的相关性。方法 应用 RT-PCR 技术及 PCR 技术分别扩增 hMSH2 基因 mRNA 和 hMSH2 基因外显子 13, 用 DNA 测序技术测定扩增的 hMSH2 cDNA 序列、IVS12(-6)T>C 多态性和外显子 13 序列。结果 23 例结直肠癌样本 hMSH2 mRNA 均出现外显子 13 缺失的转录本, 35 例健康对照样本中 31 例出现 hMSH2 mRNA 外显子 13 缺失转录本, 频率分别为 100.0% 和 88.6% ($P>0.05$)。23 例结直肠癌患者及 35 例正常对照样本均未发现基因组 hMSH2 基因外显子 13 缺失, 16 例结直肠癌样本及 19 例健康对照样本检出 ISV12(-6)T>C 位点突变, 频率分别为 69.5% 和 52.3% ($P>0.05$)。结论 外周血白细胞 hMSH2 基因 mRNA 外显子 13 缺失及 IVS12(-6)T>C 多态性是人群中是常见的变异, 与散发性结直肠癌无相关性, 剪接位点 ISV12(-6)T>C 变异不是导致 hMSH2 基因 mRNA 外显子 13 缺失的原因。

关键词:结直肠癌; 基因; 聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.15.005

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)15-1979-03

Analysis on deletion of hMSH2 mRNA exon 13 and ISV12(-6) T>C polymorphism in sporadic colorectal cancer patients

Wang Xiaoying¹, Zhou Daifeng², Chen Yong³, Meng Jin³, Cai Wangwei^{2△}

(1. Department of Biotechnology Laboratory, Hainan Medical College, Haikou, Hainan 571199 China;

2. Department of Biochemistry, Hainan Medical College, Haikou, Hainan 571199, China;

3. Department of Oncological Surgery, Affiliated Hospital, Hainan Medical College, Haikou, Hainan 570102, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation between the deletion of exon 13 of hMSH2 mRNA in peripheral blood leukocyte and ISV12(-6) T>C polymorphism with sporadic colorectal cancer. **Methods** Total RNA and genomic DNA were extracted from peripheral blood of colorectal cancer patients and healthy controls. RT-PCR and PCR were used to amplified the mRNA and exon 13 of hMSH2 gene. The sequences of amplified hMSH2 cDNA, ISV12(-6) T>C polymorphism and exon 13 sequence were confirmed by DNA sequencing. **Results** 23 of 23 (100%) patients and 31 of 35 controls (88.6%, $P>0.05$) were found to have an hMSH2 truncated transcript caused by a deletion of exon 13. No deletions of exon 13 in hMSH2 gene were identified in genomic DNA. 16 of 23 patients (69.5%) and 19 of 35 control (52.3%, $P>0.05$) were found to have the T>C transition six bases upstream of exon 13 of hMSH2. **Conclusion** Deletion of hMSH2 mRNA exon 13 in peripheral blood leukocyte and the ISV12(-6) T>C polymorphism are common variants in population and have no correlation with sporadic colorectal cancer. The variant of splice site ISV12(-6)T>C is not a reason causing the deletion of hMSH2 mRNA exon 13.

Key words: colorectal cancer; genes; polymerase chain reaction

结直肠癌是最常见的人类恶性肿瘤之一, 其发生率逐年增高。研究表明, 结直肠癌的发生除了与癌基因激活和抑癌基因失活密切相关外, 还与错配修复基因(MMR)系统密切相关。MMR 系统是一种重要的复制后修复系统, 在维持 DNA 复制保真性和基因组的稳定性方面起着的作用。目前已发现至少有 9 种 MMR, 包括 hMSH2、hMLH1、hPMS1、hPMS2、hMSH3、和 hMSH6 等^[1]。研究表明, 这些基因的遗传性突变是导致遗传性非息肉性结直肠癌(HNPCC)及部分散发性结直肠癌的重要原因, 其中大部分突变是 hMSH2 和 hMLH1 基因突变^[2-4]。在白种人群中的研究发现, 外周血白细胞 hMSH2 基因 mRNA 外显子 13 缺失在遗传性大肠癌患者和正常人群中均为常见的缺失^[5-9], 但两个人群之间的频率无明显差异。而 hMSH2 基因的 IVS12(-6)的剪接位点存在 T>C 多态性均存在于大肠癌和正常人群中^[7-9], 但大肠癌患者人群中 IVS12(-6)C 的频率高于正常人群^[7-9]。为了了解海南人群中 hMSH2 基因 mRNA 外显子 13 缺失及 IVS12(-6)T>C 多态性的分布

特点及与散发性结直肠癌的关系, 研究者分析了散发性结直肠癌患者及正常对照样品中外周血白细胞 hMSH2 基因 mRNA 外显子 13 缺失及 IVS12(-6)T>C 多态性, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2012 年 6 月至 2013 年 1 月间海南医学院附属医院肿瘤外科散发性结直肠血液标本 23 例, 所有病例均经病理检查证实为结直肠癌患者。其中男性 16 例, 女性 7 例, 年龄 27~75 岁, 中位年龄 56 岁。健康对照 35 例, 为无结直肠癌及其他肿瘤家族史的健康人, 其中男性 24 例, 女性 11 例, 平均年龄 22 岁。

1.2 DNA 及 RNA 样本 取患者及健康对照外周静脉血 5 mL(EDTA 抗凝), 用 TRIzol(invitrogen 公司产品)法提取全血样本总 RNA 和常规酚/氯仿法提取基因组 DNA。

1.3 PCR 引物 RT-PCR 扩增 hMSH2 mRNA 外显子 13 引物: 上游引物为 5'-CCT GTT CCA TAT GTA CGA C-3', 下游引物 5'-AAA ATG GGT TGC AAA CAT GC-3'; 扩增基因组

DNA 外显子 13 的上游引物 5'-ATT TAT TAG TAG CAG AAA GAA GTT-3'和下游引物 5'-GAC AGA GAC ATA CAT TTC TAT-3'。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

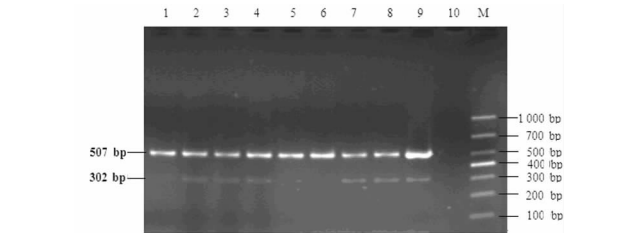
1.4 RT-PCR 扩增及序列测定 采用 TaKaRa Reverse Transcriptase M-MLV 进行逆转录,合成 cDNA,反应体系如下: RNA 1 g,5 倍逆转录缓冲液 2 μ L、Oligo dT 1 μ L、2 mmol/L dNTP 0.5 μ L、RNA 酶抑制剂 5 U、AMV 逆转录酶 3 U,最后用 DEPC 处理过的无菌水补足终体积至 10 μ L,混匀后置 Agilent SureCycler 8800 梯度 PCR 仪扩增,扩增的参数为:42 $^{\circ}$ C 30 min,99 $^{\circ}$ C 5 min,20 $^{\circ}$ C 5 min,合成 cDNA 第一链后再进行 PCR 扩增。PCR 扩增 cDNA,反应体系如下:取逆转录反应物 cDNA1 μ L,1 \times buffer(含 $MgCl_2$)、Primer 1 和 Primer 2 终浓度为 0.4 mol/L、dNTP 终浓度为 0.2 mmol/L、Taq DNA 聚合酶 1 U、无菌水调终体积至 25 μ L,混匀后置 96 梯度 PCR 仪中扩增,扩增的循环参数为:94 $^{\circ}$ C 50 s,56 $^{\circ}$ C 50 s,72 $^{\circ}$ C 1 min 30 s,重复循环 40 次,将 PCR 产物在 2%琼脂糖凝胶上电泳鉴定。PCR 产物由上海生工生物工程技术有限公司进行序列测定。

1.5 hMSH2 基因外显子 13 的 PCR 扩增及序列测定 PCR 反应体系如下:基因组 DNA 0.5 g,1 \times LA PCR buffer(含 $MgCl_2$)、Primer 3 和 Primer 4 终浓度为 0.2 mol/L、dNTP 终浓度为 0.2 mmol/L、Taq DNA 聚合酶 1 U,反应条件:94 $^{\circ}$ C 50 s,60 $^{\circ}$ C 50 s,72 $^{\circ}$ C 1.5 min,重复循环 31 次,将 PCR 产物在 2%琼脂糖凝胶上电泳鉴定。PCR 产物由上海生工生物工程技术有限公司进行序列测定。

1.6 统计学处理 所得数据采用 Fisher 确切概率法分析。

2 结 果

2.1 RT-PCR 扩增及序列分析结果 在分析的 23 例结直肠癌患者及 35 例健康对照样品中,研究者发现了 23 例结直肠癌患者及 31 例健康对照样品的 RT-PCR 产物中,除了出现预期的 507 bp 扩增区带外,还出现了 302 bp 小分子的扩增片段,但所占比例少于 507 bp 片段,结果见图 1。DNA 序列测定结果表明,302 bp 小分子的扩增片段是由于外显子 13 缺失所致,测序结果见图 2(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。结直肠癌患者及健康对照 hMSH2 基因 13 外显子缺失阳性率分别为 100.0%和 88.6%。

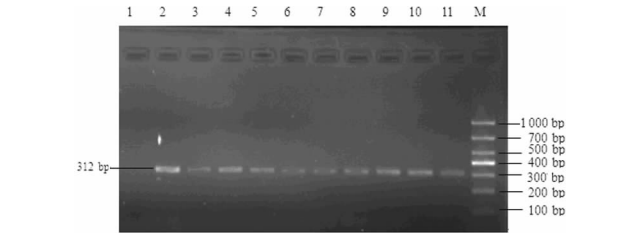


M:DL 1000 DNA 标记物(TaKaRa 公司产品);10:空白对照;1~5,7~9:hMSH2 基因外显子 13 缺失样本;6:无 hMSH2 基因外显子 13 缺失样本。

图 1 hMSH2 基因外显子 13 的 RT-PCR 扩增结果

2.2 基因组 DNA hMSH2 基因外显子 13 的 PCR 扩增及序列分析结果 在分析的 23 例结直肠癌患者及 35 例健康对照样品中,均出现预期的 312 bp 扩增区带,结果见图 3。DNA 序列测定结果表明,所有样本均未出现外显子 13 缺失。序列分析发现,部分标本存在 IVS12(-6)T>C 位点突变,结果见图 4。23 例结直肠癌样本中有 19 例存在 IVS12(-6)T>C 突变;35

例健康对照样本中有 19 例存在突变,突变率分别为 69.5%和 52.3%。



M:DL 1000 DNA 标记物;1:空白对照;2~11:hMSH2 基因外显子 13 扩增结果。

图 3 hMSH2 基因外显子 13 的基因组 DNA PCR 扩增结果

2.3 统计学分析结果 结直肠癌患者与健康对照 hMSH2 基因外显子 13 缺失情况分析 IVS12(-6)T>C 突变情况分析,见表 1。结直肠癌患者与健康对照 hMSH2 13 外显子缺失率比较差异无统计学意义($P>0.05$)。结直肠癌患者与健康对照 IVS12(-6)T>C 突变比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 结直肠癌患者与正常对照样本 hMSH2 基因外显子 13 缺失情况分析 IVS12(-6)T>C 突变情况分析

组别	RT-PCR 外显子 13 缺失			IVS12(-6)T>C	
	总例数 (n)	缺失例数 (n)	频率 (%)	突变例数 (n)	频率 (%)
结直肠癌组	23	23	100.0	16	69.5
健康对照组	35	31	88.6	19	52.3

3 讨 论

hMSH2 基因是 1993 年 Fishel 等^[5]研究人类 HNPCC 时分离克隆到的第 1 个人类 MMR 基因。该基因定位于 2p21-22,含有 16 个外显子,cDNA 全长 3 111 bp,编码 909 个氨基酸组成的蛋白。hMSH2 是进化过程中的保守基因,具有修复 DNA 碱基错配、维持基因组的稳定性和降低自发突变率的功能。

研究表明,hMSH2 基因突变与 HNPCC 及散发性结直肠癌密切相关。与 HNPCC 及散发性结直肠癌相关的 hMSH2 基因突变包括错义突变、无义突变、缺失突变及剪接位点突变^[2-4]。剪接位点突变可产生截短 mRNA 及合成截短的蛋白质,通过 RT-PCR 和蛋白质表达实验可以发现截短 mRNA 及截短的蛋白质^[5-11]。1993 年有学者报道在 HNPCC 患者外周血白细胞中发现 hMSH2 基因 mRNA 外显子 13 缺失的转录本,提示该缺失与 HNPCC 相关^[5-7]。但是,Xia 等^[8]发现报道了 hMSH2 外显子 13 缺失的 mRNA 转录本在 HNPCC、散发性结直肠癌及健康对照外周血白细胞中均有表达情况,发生率为 90%。研究者检测了 23 例散发性结直肠癌及 35 例健康对照血液样白细胞 hMSH2 基因 mRNA 外显子 13 的缺失情况,发现 23 例结直肠癌样本均出现外显子 13 缺失的 hMSH2 mRNA 转录本,35 例健康对照样本检出了 31 例外显子 13 缺失的 hMSH2 mRNA 转录本,两组出现外显子 13 缺失的 hMSH2 mRNA 转录本的阳性率分别为 100.0%和 88.6%,与 Xia 等^[8]报道的相近,提示外显子 13 缺失的 hMSH2 mRNA 转录本在人外周血中是一种常见的剪接变异体,可能与大肠癌的发生没有相关性。但是白细胞中 hMSH2 基因的表达并不一定代表其他组织(如大肠上皮细胞、大肠癌细胞)的表达情况,该剪接转录本在大肠上皮细胞及大肠癌细胞中的表(下转第 1983 页)

作用仍需对其分子发病机制进行研究,尤其需对整个青春发育期进行深入的纵向研究。

参考文献

[1] Gaytan F, Barreiro ML, Chopin LK, et al. Immunolocalization of ghrelin and its functional receptor, the type 1a growth hormone secretagogue receptor, in the cyclic human ovary[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88(2): 879-887.

[2] Martos-Moreno GA, Barrios V, Martínez G, et al. Acylated ghrelin levels in pre-pubertal obese children at diagnosis and after weight reduction: effect of oral glucose ingestion[J]. J Endocrinol Invest, 2011, 34(2): 117-123.

[3] Bellone S, Prodam F, Savastio S, et al. Acylated and unacylated ghrelin levels in normal weight and obese children: influence of puberty and relationship with insulin, leptin and adiponectin levels [J]. J Endocrinol Invest, 2012, 35(2): 191-197.

[4] Iniguez G, Román R, Youtlon R, et al. Ghrelin plasma levels in patients with idiopathic short stature[J]. Horm Res Paediatr, 2011, 75(2): 94-100.

[5] 中华人民共和国卫生部. 性早熟诊疗指南(试行)[J]. 中国儿童保健杂志, 2011, 19(4): 390-392.

[6] 王慕逖, 杜敏联, 沈永年, 等. 中枢性(真性)性早熟诊治指南[J]. 中华儿科杂志, 2007, 45(6): 426-427.

[7] 郑荣秀, 刘戈力. 女童性早熟的临床诊断程序[J]. 实用儿科临床

杂志, 2011, 26(8): 557-560.

[8] 柯江维, 段荣, 杨利. 化学发光技术检测性激素在女童性早熟诊断的临床价值[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(9): 892-893.

[9] Tena-Sempere M. Ghrelin and reproduction: ghrelin as novel regulator of the gonadotropic axis[J]. Vitam Horm, 2008, 77(1): 285-300.

[10] Whatmore AJ, Hall CM, Jones J, et al. Ghrelin concentrations in healthy children and adolescents[J]. Clin Endocrinol, 2003, 59(5): 649-654.

[11] Kellokoski E, Poykko SM, Karjalainen AH, et al. Estrogen replacement therapy increases plasma ghrelin levels[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90(5): 2954-2963.

[12] Dafopoulos K, Chalvatzas N, Kosmas G, et al. The effect of estrogens on plasma ghrelin concentrations in women[J]. J Endocrinol Invest, 2010, 33(2): 109-112.

[13] Gambineri A, Pagotto U, Tschoep M, et al. Anti-androgen treatment increases circulating ghrelin levels in obese women with polycystic ovary syndrome[J]. J Endocrinol Invest, 2003, 26(7): 629-634.

[14] Schoff C, Horn R, Schill T, et al. Circulating ghrelin levels in patients with polycystic ovary syndrome[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(10): 4607-4610.

(收稿日期: 2014-03-02)

(上接第 1980 页)

达情况及对细胞功能的影响目前尚未清楚。

在 hMSH2 基因中存在 IVS12(-6)T>C 多态性, 该多态性位于 hMSH2 基因 13 外显子 5' 端剪接位点, 该位点在不同的肿瘤中可能存在不同的作用^[12]。有些研究提示, 该位点与 hMSH2 基因 mRNA 外显子 13 的异常剪接及大肠癌的发生相关^[5-7]。但是一些研究结果并不支持该位点与 hMSH2 基因 mRNA 外显子 13 的异常剪接及大肠癌的发生相关^[8-10]。研究者还对散发性结直肠癌及健康对照样本基因组中的 hMSH2 基因外显子 13 及其侧翼的区域进行扩增及 DNA 序列分析, 结果显示散发性结直肠癌及健康对照样本均未发现基因组 hMSH2 基因外显子 13 缺失, 提示该缺失是转录或转录后加工发生的。分析外显子 13 两侧的序列发现, 散发性结直肠癌及健康对照样本存在 IVS12(-6)T>C 突变, 频率分别为 69.5% 和 52.3%, 该多态性的频率低于 mRNA 外显子 13 缺失的频率, 两者之间并不完全一致, 提示 IVS12(-6)T>C 突变可能不是导致 hMSH2 基因 mRNA 外显子 13 缺失的原因。

总之, 本研究表明, 外周血白细胞 hMSH2 基因 mRNA 外显子 13 缺失及 IVS12(-6)T>C 多态性是人群中常见的变异, 与散发性结直肠癌无相关性; IVS12(-6)T>C 多态性不影响外周血白细胞 hMSH2 基因 mRNA 外显子 13 异常剪接。

参考文献

[1] Iyer An, Plueiennik A, Burdeet V, et al. DNA mismatch repair: functions and mechanisms[J]. Chem Rev, 2006, 106(2): 302-320.

[2] Peltomäki P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer[J]. Hum Mol Genet, 2001, 10(7): 735-740.

[3] Poulgiannis G, Frayling IM, Arends MJ. DNA mismatch repair deficiency in sporadic colorectal cancer and Lynch syndrome[J].

Histopathology, 2010, 56(2): 167-179.

[4] Li D, Hu F, Wang F, et al. Prevalence of pathological germline mutations of hMLH1 and hMSH2 genes in colorectal cancer[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e51240.

[5] Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer[J]. Cell, 1993, 75(5): 1027-1038.

[6] Zahary MN, Kaur G, Abu Hassan MR, et al. Germline mutation analysis of MLH1 and MSH2 in Malaysian Lynch syndrome patients[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(8): 814-820.

[7] Luce MC, Marra G, Chauhan DP, et al. In vitro transcription/translation assay for the screening of hMLH1 and hMSH2 mutations in familial colon cancer[J]. Gastroenterology, 1995, 109(4): 1368-1374.

[8] Xia L, Shen W, Ritacca F, et al. A Truncated hMSH2 transcript occurs as a common variant in the population: implications for genetic diagnosis[J]. Cancer Res, 1996, 56(10): 2289-2292.

[9] Goessl C, Plaschke J, Pistorius S, et al. An intronic germline transition in the HNPCC gene hMSH2 is associated with sporadic colorectal cancer[J]. Eur J Cancer, 1997, 33(11): 1869-1874.

[10] Palicio M, Blanco I, Tórtola S, et al. Intron splice acceptor site polymorphism in the hMSH2 gene in sporadic and familial colorectal cancer[J]. Br J Cancer, 2000, 82(3): 535-537.

[11] Pagenstecher C, Wehner M, Friedl W, et al. Aberrant splicing in MLH1 and MSH2 due to exonic and intronic variants[J]. Hum Genet, 2006, 119(1/2): 9-22.

[12] Wu S, Chen J, Ji Y, et al. Association between the hMSH2 IVS12-6 T>C polymorphism and cancer risk: a meta-analysis[J]. Exp Ther Med, 2011, 2(6): 1193-1198.

(收稿日期: 2014-01-28)