

# Relationship Between *PTEN* Gene Mutation and Microsatellite Alteration in Sporadic Colorectal Cancer

## 散发性结直肠癌 *PTEN* 基因突变 与微卫星改变间的 关系

ZHANG Jing<sup>1</sup>, TENG Lei<sup>2</sup>, ZHAN Yu-zhu<sup>2</sup>

(1. Department of students' s Affairs, Qingdao University Medical College, Qingdao 266021, Shandong, China; 2. Biology Department, Qingdao University Medical College, Qingdao 266021, Shandong, China)

张 静<sup>1</sup>/滕 蕾<sup>2</sup>/战玉竹<sup>2</sup>

(1. 青岛大学医学院学生工作办公室, 山东青岛 266021; 2. 青岛大学医学院生物系, 山东青岛 266021)

**【摘要】**背景与目的: 研究散发性结直肠癌(Sporadic colorectal cancer, SCRC)组织中抑癌基因 *PTEN* 突变高发区外显子 5、7 和 8 的突变与人类结直肠癌基因不稳定性间的关系, 以进一步研究结直肠癌的分子遗传学发病机制。材料与方法: 采用聚合酶链反应(PCR)、PCR 结合单链构象多态性(PCR-SSCP)技术对 68 例散发性结直肠癌患者的癌组织及其癌旁组织的 *PTEN* 基因第 5、7 和第 8 外显子突变情况和结直肠癌高度敏感的微卫星检测位点 Bat25、Bat40 及 D18S21 的改变情况进行检测分析。结果: 微卫星改变阳性个体组中 *PTEN* 基因突变发生率为 28.57% (4/14), 与微卫星改变阴性个体组中 *PTEN* 基因突变发生率相比较, 差异有统计学意义  $\chi^2 = 8.06, P < 0.01$ 。结论: *PTEN* 基因的突变在微卫星不稳定性结直肠癌的发生发展中产生一定的作用。

**【关键词】**结直肠癌; 杂合性缺失; 微卫星不稳定性; 抑癌基因; 单链构象多态性; 突变

中图分类号: R730

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2006)03-0245-04

**【ABSTRACT】** BACKGROUND & AIM: To determine the relationship between the mutation frequency of exon5, exon7 and exon8 of *PTEN* gene and microsatellite alterations(MA) and explore the pathogenesis of human sporadic colorectal cancer. MATERIAL AND METHODS: by polymerase chain reaction(PCR), and PCR combined with single strand conformation polymorphism(PCR-SSCP) mutation was found at exon5, exon7 and exon8 of *PTEN* gene and MA was detected at microsatellite loci Bat25, Bat40 and D18S21 in tumor and adjacent colorectum tissues excised from 68 cases with sporadic colorectal cancer. RESULTS: The mutation frequency of *PTEN* gene in MA positive group was 28.57% (4/14), in contrast with that of MA negative group, the difference was significant ( $\chi^2 = 8.06, P < 0.01$ ). CONCLUSION: Mutation of *PTEN* gene was significantly associated with MA in human colorectal cancer.

**【KEY WORDS】** colorectal cancer; loss of heterozygosity; microsatellite instability; tumor suppressor gene; single strand conformation polymorphism(SSCP); mutation

1997 年, *PTEN* (phosphatase and tensin homolog deleted on chromo-some ten, *PTEN*)<sup>[1]</sup>/*MMAC1* (mutated in multiple advanced cancers1, *MMAC1*)<sup>[2]</sup>/*TEP1* (TGF- $\beta$ -regulated and epithelial cell-enriched phosphatase 1, *TEP1*)<sup>[3]</sup> 基因被克隆且成为抑癌的候选基因<sup>[1,2]</sup>, 它位于 10q23.3, 有 9 个外显子和 8 个内含子, 全长 200 kb, 其蛋白产物与张力蛋白(tensin)、辅助蛋白(auxilin)和酪氨酸磷酸(酯)

酶有同源性。*PTEN* 基因的突变已在几种人类的肿瘤和肿瘤细胞株中被确定, 包括脑瘤、子宫内膜癌、前列腺癌、乳腺癌和黑(素)瘤, 并在这些器官的肿瘤发生中起着重要的作用。在子宫内膜癌, 尤其是微卫星不稳定性子宫内膜癌中 *PTEN* 基因的突变频繁发生。且近年来的研究亦阐述了结直肠癌 *PTEN* 基因重复序列中移码突变的存在<sup>[4,5]</sup>, 所以本研究采用聚合酶链反应(Polymerase

收稿日期: 2005-08-25; 修订日期: 2005-12-30

作者简介: 张 静(1974- ), 女, 山东省青岛人, 讲师, 硕士, 从事分子生物学方面的研究。Tel: 86-532-82791735, E-mail: jingdetigers@163.com

chain reaction, PCR) 技术、PCR 结合单链构象多态 (Single strand conformation polymorphism, SSCP) 技术, 分别对结肠直肠癌患者的癌组织及其癌旁组织 *P TEN* 基因第 5、7 和 8 外显子的突变情况以及 D18S21、Bat25 和 Bat40 共 3 个微卫星位点的微卫星改变进行了检测, 以研究人类结肠直肠癌发病机制中 *P TEN* 基因突变与微卫星改变的相关性, 探讨结肠直肠癌发生的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 标本来源

68 例标本均为青岛大学医学院附属医院普外科手术病人, 均为新发散发性结肠直肠癌 (家族中 3 代均无结肠直肠癌病史)。其中男 38 例, 女 30 例; 年龄 20~79 岁, 平均 61.7 岁。术中所取癌组织、癌旁区 (距癌边缘 2~5 cm) 组织和正常粘膜 (远端切缘) 组织均经病理诊断证实。组织取下后即投入液氮中保存, 直至提取基因组 DNA。病人术前均未接受放疗、化疗。

### 1.2 组织 DNA 的提取

取手术病人米粒大小结肠组织 (包括癌组织、癌旁组织和正常组织), 生理盐水冲洗 3 次, 用剪刀将组织剪碎, 加入 10× DNA 抽提缓冲液 (0.25 mol/L NaAc, 25 mmol/L EDTA, 3% SDS, pH 6.4) 400 μl, 加 10% SDS 和蛋白酶 K (10 mg/ml) 至终浓度分别为 0.5% 和 100 μg/ml, 50 °C 水浴 3 h。期间数次颠倒混匀。酚-氯仿抽提, 无水乙醇沉淀, TE 溶解。用 UV<sub>250</sub> 冷紫外分光光度计测得 UV<sub>260</sub>/UV<sub>280</sub> 比值大于 1.8, 置 -20 °C 备用。

### 1.3 PCR 方法

**1.3.1 PCR 引物<sup>[6]</sup>合成** 由上海生工生物工程公司合成。PCR 引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物  
Table 1 PCR primers

Primer	Location	Product length (bp)	Annealing temperature (°C)	Nucleotide sequence (5'→3')
BAT-40	1p13	126	57	5'-attaacttctacaccacaac-3' 5'-gtagagcaagaccacctg-3'
BAT-25	4q12	125	57	5'-tcgcctccaagaatgtaagt-3' 5'-cttgcattttaactatggctc-3'
D18S21	18q21	143	54	5'-aggcatttgcagggtg-3' 5'-gatgtgtgcatgtgttct-3'
EXON 5A	10q23	158	48	5'-attctgaggttatctttta-3' 5'-ttcactgtaaagctgaaag-3'
EXON 5B	10q23	186	54	5'-gctaagtgaagatgacaatca-3' 5'-ttattttttagtgttttct-3'
EXON 7	10q23	229	57	5'-cctgtgaataactggtatg-3' 5'-ctcccaatgaaagtaagta-3'
EXON 8A	10q23	159	55	5'-acacatcacatatacaagtc-3' 5'-gtgcagataatgacaaggaat-3'
EXON 8B	10q23	245	55	5'-ttaaataatgtcatttctttt-3' 5'-acaagcaataaagacaag-3'

**1.3.2 PCR 扩增** 以从组织细胞中提取的 DNA 为模板, 以人工合成的寡核苷酸为引物, 在美国 PE 公司生产的 DNA Thermal CYCLER (TC1) 进行 PCR 扩增。25 μl 反应体系中含: 10× Buffer 2.5 μl, 4× dNTP (10 mmol/l) 0.5 μl, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/l) 1.5~2 μl, 引物 I、II 各 (20 μmol/L) 1.25 μl, 模板 DNA 3 μl, TaqDNA 聚合酶 0.2 μl, 去离子水 14.3~14.8 μl。PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 95 °C 30 s, 48~57 °C 30 s, 72 °C 45 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。引物改变时, 根据引物及扩增产物的长度调整反应条件。

### 1.4 PCR-SSCP 技术检测 *P TEN* 基因的突变

取 *P TEN* 基因的 PCR 扩增产物 3 μl 加入等体积变性示踪剂 (95% 甲酰胺、10 mmol/L EDTA、0.25% 溴酚蓝、0.25% 二甲苯青) 混匀离心, 95 °C 热变性 15 min 后迅速置于 -20 °C 骤冷 8 min。6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶 (交联度为丙烯酰胺: 甲叉双丙烯酰胺 = 49: 1) 预电泳 1 h 后, 加入 6 μl 变性产物, 200 V、20 W 恒功率电泳约 1.5~2 h。电泳后凝胶银染操作同前。为提高 SSCP 检出率, 减少假阴性结果, 采用不同的电压 (100 V、200 V、350 V) 在不同温度 (4 °C、室温) 下进行电泳, 相同样本的检测结果一致。

### 1.5 统计学方法

采用校正卡方检验。

## 2 结果

### 2.1 PCR-SSCP 检测结果

5 例结肠癌组织出现异常条带, 突变率为 7.35% (5/68) (总体率的 95% 可信区间为 1.1~13.7%), 其中 exon7 突变 2 例, exon8A 突变 3 例, 分别为 exon7 和 exon8A 的扩增产物, (见图 1, 2)。上述 5 例突变标本中未观察到 exon7 和 exon8A 的同时异常, 68 例相应癌旁组织标本中未检测到 exon5, exon7 和 exon8 的突变。

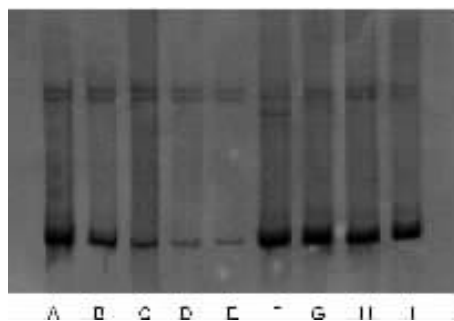


图 1 部分标本 *P TEN* 基因 exon7 PCR-SSCP 电泳结果  
Figure 1 PCR-SSCP analysis of *P TEN* gene with exon 7.  
A, B, C: normal, adjacent and cancer tissues of No.2 patient; D, E, F: normal, adjacent and cancer tissues of No.5 patient; G, H, I: normal, adjacent and cancer tissues of No.32 patient. F: cancer tissue with *P TEN* mutation

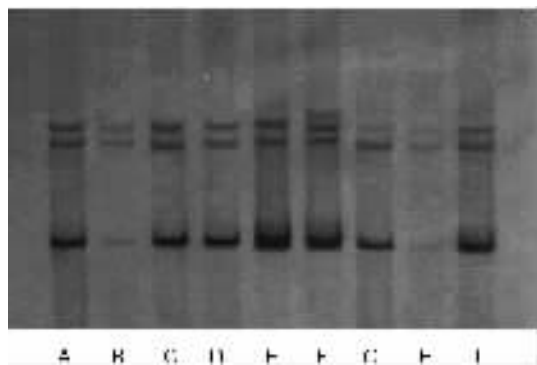


图 2 部分标本 *PTEN* 基因 exon8A PCR-SSCP 电泳结果

Figure 2 PCR-SSCP analysis of *PTEN* gene with exon 8A. A, B, C: normal, adjacent and cancer tissues of No.9 patient; D, E, F: normal, adjacent and cancer tissues of No.19 patient; G, H, I: normal, adjacent and cancer tissues of No.25 patient F:cancer tissue with *PTEN* mutation

## 2.2 结直肠癌组织微卫星改变分析

检出的微卫星改变形式主要有两类:①杂合性缺失(loss of heterozygosity, LOH):表现为肿瘤组织的某一等位基因条带消失或相对密度减少 50% 以上;②微卫星不稳定性(Microsatellite instability, MSI):表现为比正常组织出现额外条带。

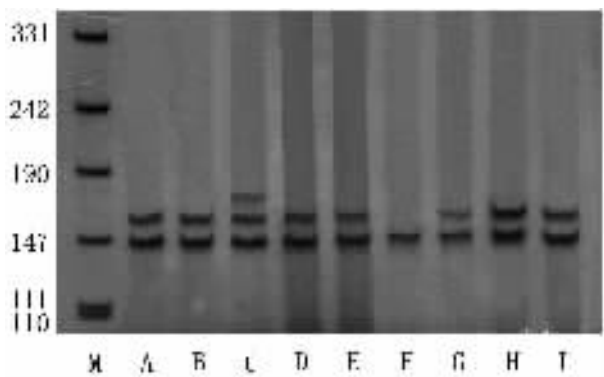


图 3 部分标本的 D18S21 微卫星改变检测结果

Figure 3 Analysis of MA at microsatellite locus D18S21. M: pUC19/MspI marker; A, B, C: normal, adjacent and cancer tissues of No.5 patient; D, E, F: normal, adjacent and cancer tissues of No.19 patient; G, H, I: normal, adjacent and cancer tissues of No.17 patient. C, F: cancer tissues with MA

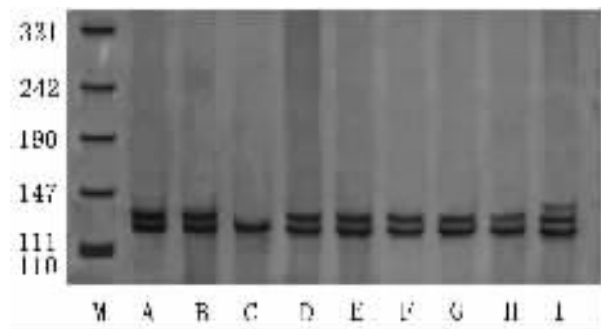


图 4 部分标本 *Bat25* 的微卫星改变检测结果

Figure 4 Analysis of MA at microsatellite locus *Bat25*. M: pUC19/MspI marker; A, B, C: normal, adjacent and cancer tissues of No.5 patient; D, E, F: normal, adjacent and cancer tissues of No.24 patient, G, H, I: normal, adjacent and cancer tissues of No.11 patient; C, I: cancer tissues with MA

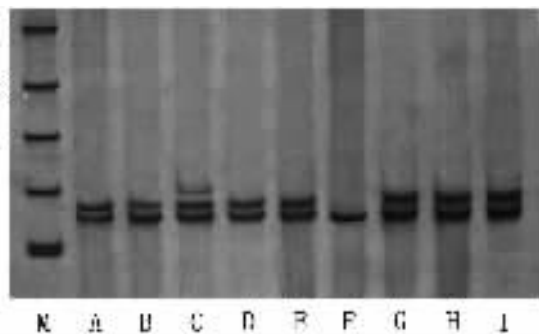


图 5 部分标本 *Bat40* 的微卫星改变检测结果

Figure 5 Analysis of MA at microsatellite locus *Bat40*. M: pUC19/MspI marker; A, B, C: normal, adjacent and cancer tissues of No.11 patient; D, E, F: normal, adjacent and cancer tissues of No.19 patient; G, H, I: normal, adjacent and cancer tissues of No.1 patient; C, F: cancer tissues with MA

本研究 68 例结直肠癌的癌组织中有 20 例发生了至少一个位点的微卫星改变,其中 2 例有 3 个位点发生改变,12 例有 2 个位点发生改变,发生率为 29.41% (20/68)。D18S21 位点、*Bat25* 位点和 *Bat40* 位点的发生率分别为 14.71% (10/68)、20.59% (14/68) 和 17.65% (12/68),所有患者的癌旁组织未检测到微卫星改变(见图 3~5)。3 个位点中有 2 个或 2 个以上位点显示微卫星改变的病例则视为阳性个体组,本研究共有 14 例为微卫星改变阳性个体。

## 2.3 结直肠癌组织 *PTEN* 基因突变与微卫星改变间的关系

5 例发生 *PTEN* 基因突变的病例中有 4 例为微卫星改变阳性个体,发生率为 28.57% (4/14) (其总体率的 95% 可信区间为 8~58%),提示 *PTEN* 基因是 MA 结肠癌发生发展中微卫星不稳定的靶基因。经校正卡方检验,差异有统计学意义( $\chi^2 = 8.06, P < 0.01$ )。

## 3 讨论

大肠癌是十分常见的恶性肿瘤之一,其发病率占各种恶性肿瘤的第三位,它的发生发展是一个涉及多种基因改变和多阶段致癌的复杂过程,包括癌基因的激活,抑癌基因的失活和缺失,错配修复基因的突变等,其中抑癌基因的异常在大肠癌发生发展中起主导作用。*PTEN* 基因失活可表现为:突变或(和)丢失;*PTEN* 基因 mRNA 或蛋白表达降低,甚至不表达。文献报道,*PTEN* 基因的突变位点位于编码磷酸酶的功能区,即第 5 外显子区,占总突变率的 50%~60%;但是,也有些较常见的突变位点位于 *PTEN* 基因 C-端的区域,即第 7 和第 8 外显子区,该区域调节 *PTEN* 的稳定性和磷酸酶的生物学活性。研究发现:胃肠道是错构瘤息肉和 Cowden 病病人发生癌症最初的靶器官,这时发生了 *PTEN* 基因的胚

系突变<sup>[7]</sup>,并且胃肠道息肉和肿瘤的发展恶化在敲除了 *PTEN* 基因的小鼠中亦有报道。本研究选择 *PTEN* 基因的第 5、7 和第 8 外显子作为研究对象,采用 PCR-SSCP 技术分析检测大肠癌组织及其癌旁组织中 3 种外显子的突变情况。由于 SSCP 检测方法对小于 300 个碱基的片段的灵敏度高,所以将外显子 5 和 8 分别分为两个片段设计两对特异性引物,以提高 PCR-SSCP 检测 *PTEN* 基因突变的敏感性。

微卫星是小片段核苷酸序列的串联重复序列,大多为二核苷酸或三核苷酸,微卫星的重复单位的碱基对数目不变,而串联在一起的重复单位的数目是随机改变的,其重复单位数目的改变可以引起相当高的多态性。肿瘤中微卫星不稳定的发生反映了 DNA 错配修复的缺陷,它是肿瘤发生的早期事件,本身不足以引起肿瘤,但它使 DNA 复制的忠实性降低,抑癌基因或原癌基因的突变增多,最终导致肿瘤的发生。微卫星不稳定是近几年在肿瘤研究,尤其是结直肠癌发生机制及筛选标记等方面的一个研究热点<sup>[8]</sup>。本研究检测的 BAT-25、BAT-40 及 D18S21 均为结直肠癌中高度敏感的微卫星的检测位点<sup>[9]</sup>。

虽然近来研究中报道过 *PTEN* 基因突变在 MA 大肠癌发病中的作用,但在这个领域的研究仍很有限。研究发现:第一,MA 型大肠癌的肿瘤发生机制部分是由于在基因编码区的微卫星重复序列发生了移码突变,而这一区域的失活在癌症的发生中产生作用。重复序列的频繁突变不仅发生在内含子亦发生在外显子区,表明任何包含足够长度重复序列的基因都可能是 MA 型大肠癌基因不稳定的靶基因。*PTEN* 基因的第 7、8 外显子包含有 6 个腺苷酸的重复序列,所以 *PTEN* 基因就可能成为 DNA 错配修复缺陷的候选靶基因;第二,根据 Frayling 等<sup>[10]</sup>的报道,*PTEN* 基因所在的 10q23 位点的杂合性缺失在大肠癌中经常发生,在子宫内膜、前列腺与皮肤也是如此。综上所述,这些报道表明 *PTEN* 基因缺陷使胃肠道上皮过度增生,由此在大肠癌发生中产生作用。

本研究中 68 例大肠癌组织及其癌旁组织中共有 14 例为微卫星改变阳性个体,5 例发生了 *PTEN* 基因突变,其中有 4 例 *PTEN* 基因的突变发生在微卫星改变阳

性个体组中,发生率为 28.57% (4/14),与微卫星改变阴性个体组中的 *PTEN* 基因突变发生率相比较,差异有统计学意义 ( $\chi^2 = 8.06, P < 0.01$ ),大肠癌中 *PTEN* 基因的突变与微卫星改变相关。

### 参考文献:

- [1] 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*, 1997,275:1 943 - 1 947.
- [2] Steck PA, Pershous 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: 356 - 362.
- [3] Li DM, Sun H. TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor  $\beta$ 1[J]. *Cancer Res*, 1997,57: 2 124 - 2 129.
- [4] Guanti G, Kesta N, Simone C et al. Involvement of PTEN mutations in the genetic pathways of colorectal cancerogenesis [J]. *Hum Mol Genet*, 2000,9(2):283 - 287.
- [5] Zhou XP, Loukola A, Salovaara R, et al. PTEN mutational spectra, expression levels, and subcellular localization in microsatellite stable and unstable colorectal cancers[J]. *Am J Pathol*, 2002, 161(2): 439 - 447.
- [6] Risinger JI, Hayes AK, Berchuck A, et al. PTEN/ MMAC1 mutations in Endometrial Cancers[J]. *Cancer, Germline Res* 1997,57(21): 4 736 - 4 738.
- [7] Marsh DJ, Dahia PL, Carsons, et al. PTEN mutations in Cowden syndrome-like families[J]. *J Med Genet*, 1998,35(11): 881 - 885.
- [8] Kuismanen SA, Moisio AL. Endometrial and colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colon cancer display different patterns of microsatellite instability[J]. *Am J Pathol*, 2002, 160(6): 1 953 - 1 958.
- [9] Ku JL, Yoon KA, Kim DY, et al. Mutations in Hmsh6 alone are not sufficient to cause the microsatellite instability in colorectal cancer cell lines [J]. *Eur J Cancer*, 1999, 35: 1 724 - 1 729.
- [10] Frayling IM, Bodmer WF, Tomlinson IP. Allele loss in colorectal cancer at the Cowden disease/ juvenile polyposis locus on 10q [J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 1997,97:64 - 69.