

· 论 著 ·

1 例家族性腺瘤性息肉病患者的 APC 基因突变诊断

潘 红¹, 高洪柳¹, 吴秋月¹, 李卫巍¹, 李天赋¹, 夏欣一¹, 王卫萍¹, 许豪勤²

[摘要] **目的** 对 1 例家族性腺瘤性息肉病患者进行结肠息肉病致病基因 (adenomatous polyposis coli, APC) 的突变检测。**方法** 从患者外周血中提取基因组 DNA, 用目标序列捕获结合二代测序技术对 APC 致病基因进行测序并用 Sanger 测序验证。**结果** 患者的 APC 经分析后发现 1 个杂合的缺失突变 c. 3931_3925delAAAAG (p. Ile1307IlefsX6); 该突变引起 APC 基因的编码序列移码突变, 产生一个提前终止的密码子, 生成一截短的蛋白而影响蛋白功能。**结论** APC 基因编码区的缺失突变 c. 3931_3925delAAAAG (p. Ile1307IlefsX6) 为该患者的致病原因。

[关键词] 家族性腺瘤性息肉病; 结肠息肉病基因; 缺失突变

[中图分类号] R735.3 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2014.06.002

Diagnosis of APC gene mutation in a patient with familial adenomatous polyposis

PAN Hong¹, GAO Hong-liu¹, WU Qiu-yue¹, LI Wei-wei¹, LI Tian-fu¹, XIA Xin-yi¹, WANG Wei-ping¹, XU Hao-qin². 1. Department of Central Laboratory, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing, Jiangsu 210002, China; 2. Jiangsu Province Research Institute of Planned Parenthood, Nanjing, Jiangsu 210029, China

[Abstract] **Objective** To diagnose the mutation of adenomatous polyposis coli (APC) in a patient with familial adenomatous polyposis (FAP). **Methods** Genomic DNA was extracted from peripheral blood of the patient. Target region enrichment combined with next generation sequencing was performed for the patient. The mutation screened by target region capture sequencing was further identified by Sanger sequencing. **Results** A heterozygous deletion mutation of c. 3931_3925delAAAAG, p. Ile1307IlefsX6 in APC was identified, which resulted in a frameshift within the coding sequence and brought about a premature translation termination codon. **Conclusion** The mutation of c. 3931_3925delAAAAG (p. Ile1307IlefsX6) in APC gene contributed to the pathogenesis of familial adenomatous polyposis.

[Key words] familial adenomatous polyposis (FAP); adenomatous polyposis coli (APC); deletion mutation

家族性腺瘤性息肉病 (familial adenomatous polyposis, FAP) 于 1925 年首次被报道^[1], 是遗传性结肠息肉病中最常见的一种, 属常染色体显性遗传性疾病。其典型的临床表现为患者从青春期开始, 结肠黏膜出现弥漫性腺瘤性息肉, 如未及时治疗, 通常在 40 岁左右发展为结直肠癌, 是导致 FAP 患者死亡的重要原因^[2]。随着分子生物学技术的发展, 证实 FAP 的发生与结肠息肉病基因 (adenomatous polyposis coli, APC) 的突变密切相关^[3-5]。其中 1/3 的突变发生在 APC 基因密码子 1061-1309 区域, 少数突变发生在密码子 200-1600 区域, 很少发生在密码子 1600 以外的区域^[6-7]。对 FAP 患者进行 APC 基因检测, 有助于明确致病基因突变位点, 对进一步

明确诊断及对日后的产前诊断具有重要意义。本文应用目标序列捕获结合二代测序技术对 1 例 FAP 患者进行 APC 基因测序与突变分析, 明确了该患者致病基因的突变位点。

1 材料与方法

1.1 病例报告 患者女, 27 岁, 因患 FAP 10 年要求进行基因诊断。患者 17 岁时因反复的黏液便就诊, 经肠镜检查发现整个结肠直肠分布数千个息肉, 经活检后病理证实为 FAP, 于外院行全结肠切除回肠直肠吻合术。无类似疾病家族史, 父母非近亲结婚。该项研究经患者知情同意。

1.2 目标序列捕获结合二代测序 抽取患者外周血, 用试剂盒 (TIANGEN 公司产品, 北京) 提取 DNA 后, 用目标序列捕获结合二代测序技术^[8], 对 APC 基因进行测序。用芯片 (北京华大基因研究院) 捕获靶片段, 芯片上的探针包括 FAP 基因 APC 外显子、内含子, 非编码区域和其他单基因疾病的 116 个基因。以 Gao 等^[8]所述 DNA 提取、靶片段的捕获及二代测序的方法进行, 即通过 Covaris 的方法将 1 g

基金项目: 江苏省自然科学基金 (BK2011660); 江苏省科技厅省级科技专项 (BM2013058); 南京军区南京总医院课题立项 (2013059)
作者单位: 1. 210002 江苏南京, 南京军区南京总医院中心实验科; 2. 210029 江苏南京, 江苏省计划生育科研所
通讯作者: 王卫萍, E-mail: njglyzjw@ sina. com; 许豪勤, E-mail: 1325825613@qq. com

高质量的基因组 DNA 样本随机片段化,然后在片段化的 DNA 两端连接上测序接头后扩增、纯化、与探针 (GenCap™ Enrichment, MyGenostics 产品, 美国) 杂交后富集。杂交产物结合到磁珠上并洗脱,对捕获的 DNA 库进行高通量测序。通过 Illumina pipeline (版本 1.3.4) 进行图像分析、误差估计及碱基识别。对照数据库 (dbSNP135 与 HapMap 数据库)、千人基因组突变数据库 (1000 genome variants database) 和 当地对照数据库 (the local control database) 报告遗传变异频数,在上述的任何一个数据库中突变频率低于 1% 即被视为可疑突变点。测序及数据分析均由北京华大基因研究院完成。

1.3 Sanger 测序验证 通过 Primer Premier 5 and Oligo 7.27 设计引物,引物序列如文献珠珠等^[9] 所述。以 PCR 扩增 APC (NM_000038) 编码区域及内含子序列并测序,严格按说明书进行。

2 结 果

2.1 目标序列捕获结合二代测序 患者的 APC 基因各外显子测序后分析,未发现存在大片段缺失或重复。在 APC 基因编码区发现 1 个杂合的缺失突变 c.3931_3925delAAAAG (图 1);该突变位于第 16 号外显子上,引起 APC 基因的移码突变,导致翻译提前终止。同时还发现该患者 APC 基因编码区存在多个错义及同义突变 (p. Tyr486Tyr, p. Ala545Ala, p. Thr1493Thr, p. Gly1678Gly, p. Ser1756Ser, p. Val1822Asp, p. Pro1960Pro),但在数据库 (dbSNP135 与 HapMap)、千人基因组突变数据库和当地对照数据库中频率均高于 0.01% (表 1),因此均为多态性位点。

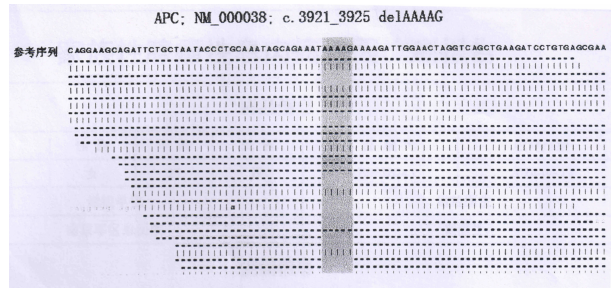
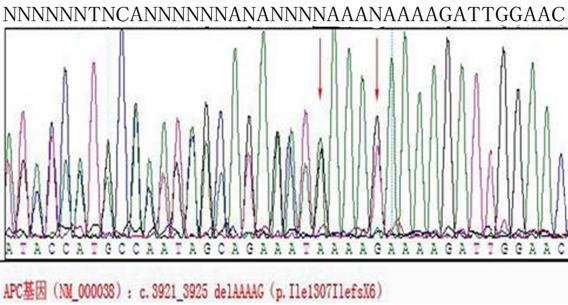


图 1 目标序列捕获结合二代测序

2.2 Sanger 测序验证 在 APC 基因中存在缺失突变 c.3921_3925delAAAAG (p. Ile1307IlefsX6) (图 2),为杂合缺失突变;与二代测序高通量结果一致。在千人基因组突变数据库和当地对照数据库中,关于此位点出现的频率均为 0;同时此位点也未被 dbSNP135 和 HapMap 数据库收录,排除了其 SNP (单核苷酸多态)的可能。

表 1 患者 APC 基因中其他变异在各数据库中的频率信息

变异名称	dbSNP135 数据库	HapMap 数据库	千人基因组 突变数据库	当地对照 数据库
p. Tyr486Tyr	0.284	0.460	0.317	0.457
p. Ala545Ala	0.437	0.652	0.453	0.702
p. Thr1493Thr	0.438	0.65	0.454	0.702
p. Gly1678Gly	0.441	0.664	0.457	0.702
p. Ser1756Ser	0.440	0.639	0.456	0.690
p. Val1822Asp	0.734	0.825	0.758	0.811
p. Pro1960Pro	0.440	0.650	0.455	0.702



“↓”为突变所在位置
图 2 Sanger 测序验证结果

3 讨 论

FAP 是一种常染色体显性遗传性疾病,其遗传符合 Mendelian 定律,外显率达 90% 以上^[10],多见于家族遗传,偶见于无家族史的散发患者,为亲代生殖细胞突变而形成新发生的病例。FAP 的主要病理变化是肠道内广泛出现数十到数百个大小不一的息肉,严重者息肉数量可达数千个^[11-12]。发病初期无明显的症状,随着息肉的增多、增大,患者可出现腹部不适、腹痛、血便或黏液便、大便次数增多等表现。同时 FAP 还可有肠外表现,如上消化道息肉^[13]、先天性视网膜色素上皮细胞肥大^[14]、表皮上皮样囊肿、下颌骨骨瘤^[15]和硬纤维瘤病^[16-17]等。

FAP 的遗传学基础依赖于 APC 基因的突变^[18-19]。APC 基因位于 5q21 上^[20],长 8535 bp,包含 21 个外显子^[21],编码 2843 个氨基酸构成的蛋白^[22]。该蛋白具有多种细胞作用,包括 wnt 信号通路中的信号转导作用,介导细胞间黏附,稳定细胞骨架,调节细胞周期及凋亡等作用。目前报道 APC 基因在体细胞或生殖细胞中的突变位点超过 1400 个^[19,23],其中第 15 个外显子较大,约包含 APC 基因 75% 的编码序列,是体细胞或生殖细胞突变容易出现的位点^[6],其 5' 端存在一个突变密集区,40% ~ 77% 的突变集中在这一区域^[23-24],约 95% 的突变是无义突变或移码突变,从而导致 APC 基因翻译提前

终止,形成一个截短蛋白。

FAP 的遗传型与表型之间分析显示,数量多于 5000 个息肉的严重息肉病,突变通常位于密码子 1250 和 1464 之间^[25]。密码子 1309 的突变易引起特别严重的表型,且发病较早^[26-27]。相反,少于 100 个腺瘤性息肉的衰减型息肉病 (Attenuated FAP, AFAP) 常由于 APC 基因 5' 或 3' 末端的突变,或者是外显子 9 中拼接区域的突变^[28-29]。先天性视网膜色素上皮细胞肥大仅在突变位于密码子 457 和 1444 之间的患者中出现^[28,30-31]。已发现携带有息肉之外表型如硬纤维瘤,骨瘤,表皮样囊肿及上消化道息肉的突变患者,突变最常见于密码子 1445 和 1578^[30]或密码子 1395 和 1493^[32]之间。肝胚细胞瘤的突变集中在 5' 端^[32]。

本文对该患者的 APC 基因各外显子测序发现 1 个杂合的移码突变,即 c. 3921_3925delAAAAG, p. Ile1307IlefsX6。该突变导致 APC 基因翻译提前终止,生成一个截短的蛋白,这个短小蛋白可能导致无义突变介导的 mRNA 降解或单倍剂量不足^[33]。已有文献^[34]发现密码子 1307-1311 是高频率的体细胞突变点。I1307K 起初发现存在于犹太人,且此突变的携带者患多个腺瘤及结直肠癌的风险比正常人高数倍^[35]。同时在此突变位点,国外研究发现从 3921 处开始的 5 个碱基 AAAAG 的缺失,所致的息肉病比其他位点突变的患者要严重,死于结直肠癌的时间比其早^[26,36],且此突变在息肉病患者中发生频率极低,而在国内尚无此突变位点报道。本文采用的二代测序结果与 Sanger 测序结果一致,因此可认为 APC 基因编码区 (c. 3931_3925delAAAAG, p. Ile1307IlefsX6) 的缺失突变为该患者的致病原因。

【参考文献】

- [1] Lockhart-Mummery A. Cancer and Heredity [J]. Lancet, 1925, 1: 424-429.
- [2] Maureen J, Tommie V, Curimin T. Familial adenomatous polyposis from beside to benchside [J]. Am J Clin Path, 1998, 109 (5): 521-526.
- [3] Cottrell S, Bicknell D, Kaklamanis L, et al. Molecular analysis of APC mutations in familial adenomatous polyposis and sporadic colon carcinomas [J]. Lancet, 1992, 340 (8820): 626-630.
- [4] Nagase H, Nakamura Y. Mutations of the APC (adenomatous polyposis coli) gene [J]. Hum Mutat, 1993, 2 (6): 425-434.
- [5] Laken SJ, Papadopoulos N, Petersen GM, et al. Analysis of masked mutations in familial adenomatous polyposis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96 (5): 2322-2326.
- [6] Bérout C, Soussi T. APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumours and cell lines [J]. Nucleic Acids Res, 1996, 24 (1): 121-124.
- [7] Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF. The ABC of APC [J].

- Hum Mol Genet, 2001, 10 (7): 721-733.
- [8] Gao R, Liu Y, Gjesing AP, et al. Evaluation of a target region capture sequencing platform using monogenic diabetes as a study-model [J]. BMC Genet, 2014, 15: 13.
- [9] 珠珠, 黄鉴, 董坚, 等. 5 个家族性腺瘤样息肉病家系 APC 基因突变研究 [J]. 西部医学, 2012, 24 (9): 1654-1657.
- [10] Bulow S. Diagnosis of familial adenomatous polyposis [J]. World J Surg, 1991, 15 (1): 41-46.
- [11] Half E, Bercovich D, Rozen P. Familial adenomatous polyposis [J]. Orphanet J Rare Dis, 2009, 4: 22.
- [12] 汪芳裕. 溃疡性结肠炎相关大肠癌研究进展 [J]. 东南国防医药, 2013, 15 (4): 376-380.
- [13] Church JM, McGannon E, Hull-Boiner S, et al. Gastrointestinal polyps in patients with familial adenomatous polyposis [J]. Dis Colon Rectum, 1992, 35 (12): 1170-1173.
- [14] Blair NP, Trempe CL. Hypertrophy of the retinal pigment epithelium associated with gardner's syndrome [J]. Am J Ophthalmol, 1980, 90 (5): 661-667.
- [15] Gardner EJ. Follow-up study of a family group exhibiting dominant inheritance for a syndrome including intestinal polyps, osteomas, fibromas and epidermal cysts [J]. Am J Hum Genet, 1962, 14: 376-390.
- [16] Jones IT, Jagelman DG, Fazio VW, et al. Desmoid tumors in familial polyposis coli [J]. Ann Surg, 1986, 204 (1): 94-97.
- [17] Lotfi AM, Dozois RR, Gordon H, et al. Mesenteric fibromatosis complicating familial adenomatous polyposis: predisposing factors and results of treatment [J]. Int J Colorectal Dis, 1989, 4 (1): 30-36.
- [18] Rustgi AK. The genetics of hereditary colon cancer [J]. Genes Dev, 2007, 21 (20): 2525-2538.
- [19] Groen EJ, Roos A, Muntinghe FL, et al. Extra-intestinal manifestations of familial adenomatous polyposis [J]. Ann Surg Oncol, 2008, 15 (9): 2439-2450.
- [20] Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, et al. Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5 [J]. Nature, 1987, 328 (6131): 614-616.
- [21] Thliveris A, Albertsen H, Tuohy T, et al. Long-range physical map and deletion characterization of the 1100-kb Not I restriction fragment harboring the APC gene [J]. Genomics, 1996, 34 (2): 268-270.
- [22] Horii A, Nakatsuru S, Ichii S, et al. Multiple forms of the APC gene transcripts and their tissue-specific expression [J]. Hum Mol Genet, 1993, 2 (3): 283-287.
- [23] 武治国, 陈明清, 董坚, 等. 家族性腺瘤性息肉病一家系调查及 APC 基因胚系突变分析 [J]. 国际遗传学杂志, 2010, 33 (2): 117.
- [24] 黄建, 郑树. 大肠肿瘤结直肠腺瘤病基因突变的特征 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2001, 18 (5): 351-355.
- [25] Nagase H, Miyoshi Y, Horii A, et al. Correlation between the location of germ-line mutations in the APC gene and the number of colorectal polyps in familial adenomatous polyposis patients [J]. Cancer Res, 1992, 52 (14): 4055-4057.
- [26] Caspari R, Friedl W, Mandl M, et al. Familial adenomatous polyposis: mutation at codon 1309 and early onset of colon cancer [J]. Lancet, 1994, 343 (8898): 629-632.
- [27] Gayther SA, Well D, SenGupta SB, et al. Regionally clustered APC mutations are associated with a severe phenotype and occur at a high frequency in new mutation cases of adenomatous polyposis coli [J]. Hum Mol Genet, 1994, 3 (1): 53-56.

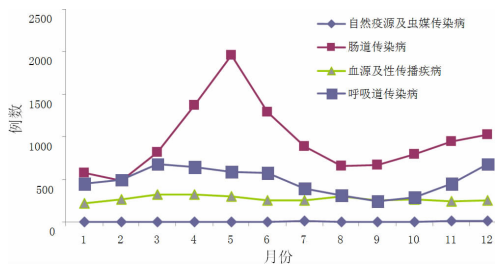


图 3 2012 年不同月份四类疾病发病情况

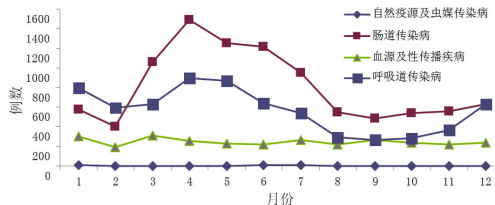


图 4 2013 年不同月份四类疾病发病情况

3 结 论

该地区为丘陵地带,水资源不丰富,部队大量进驻时供水量严重不足,因此需配备必要的水处理器材和药品,如消毒剂,澄清剂或水处理车;并应适时启用备用水井、池塘等合适水源,保障部队用水需求。对既有水源,应加强保护,控制污染。对重点水源,要安排岗哨警戒,防止投毒,人为污染等事件^[7]。完善传统的食品“安全”体系和非传统的食品“安全”识别和预警机制^[8-11],提高食品安全卫生的整体水平。

针对驻地传染病流行情况和季节性特点,要高度重视甲乙类呼吸道传染病有所上升的趋势,做好经常性防病工作;医护及卫生防疫人员加强防治,做

到早发现、早隔离、早治疗传染病人;部队进入山地、林区、农田训练时要注意做好个人防护。

该地区为疟疾流行区,外区部队人员驻训,应采取室内滞留喷洒长效杀虫剂,或蚊帐浸泡杀虫,教育战士挂好蚊帐,防治蚊虫叮咬。部队在野外活动,特别是在丛林地带活动时,应注意“打草惊蛇”;晚间接外出应带手电避免蛇咬,驻地周围应清除杂草、灌丛,减少蛇类栖息场所,外围可撒布雄磺^[12]。

【参考文献】

[1] 程传强. 大型训练基地的多功能[N]. 解放军报,2009-01-22 (10).
[2] 赵鹏飞. 南京军区合同战术训练基地揭秘: 专业的假想敌[N]. 中国青年报,2006-07-28(2).
[3] 滁州市统计局编. 滁州统计年鉴[R]. 2011;389-395.
[4] 滁州市统计局编. 滁州统计年鉴[R]. 2012;413-419.
[5] 滁州市统计局编. 滁州统计年鉴[R]. 2013;425-430.
[6] 滁州市地方志办公室编. 滁州年鉴[M]. 西安:三秦出版社, 2012;95-100.
[7] 魏德江,梁洪军,李 晶等. 非战争军事行动部队饮水和饮食卫生安全的实践与启示[J]. 解放军预防医学杂志,2013,31 (6):536.
[8] 魏德江,梁洪军,李 晶. 部队食品卫生安全工作的实践与思考[J]. 东南国防医药,2013,15(1):91.
[9] 周东明,梁洪军,唐雨德等. 某部大型军事活动食品安全风险管理[J]. 东南国防医药,2013,15(3):205.
[10] 王春艳,穆源浦. 强化食品安全信息工作机制探析[J]. 中国卫生监督杂志,2012,19(3):249-251.
[11] 徐 娇. 试论非食用物质的危害与管理[J]. 中国卫生监督杂志,2012,19(3):244-246.
[12] 魏德江,龚自力,陈乐如. 抗震救灾部队卫生防疫保障的难点与措施[J]. 解放军预防医学杂志,2010,28(2):137.

(收稿日期:2014-08-13;修回日期:2014-10-16)
(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)

(上接第 568 页)

[28] Wallis YL,Macdonald F,Hulten M,et al. Genotype-phenotype correlation between position of constitutional APC gene mutation and CHRPE expression in familial adenomatous polyposis [J]. Hum Genet,1994,94(5):543-548.
[29] Soravia C,Berk T,Madlensky L,et al. Genotype-phenotype correlation in attenuated adenomatous polyposis coli[J]. Am J Hum Genet,1998,62:1290-1301.
[30] Capari R,Olschwang S,Friedl W,et al. Familial adenomatous polyposis;desmoid tumors and lack of ophthalmic lesions (CHRPE) associated with APC mutations beyond codon 1444 [J]. Hum Mol Genet,1995,4(3):337-340.
[31] Davies DR,Armstrong JG,Thakker N,et al. Severe Gardner syndrome in families with mutations restricted to a specific region of the APC gene[J]. Am J Hum Genet,1995,57(5):1151-1158.
[32] Wallis YL,Morton DG,McKeown CM,et al. Molecular analysis of the APC gene in 205 families;extended genotype-phenotype corre-

lation in FAP and evidence for the role of APC amino acid changes in colorectal cancer predisposition[J]. J Med Genet,1999,36(1):14-20.
[33] Baker KE,Parker R. Nonsense-mediated mRNA decay;terminating erroneous gene expression[J]. Curr Opin Cell Biol,2004,16(3):293-299.
[34] Miyaki M,Konishi M,Rei Kikuchi-Yanoshita R,et al. Characteristics of somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in colorectal tumors[J]. Cancer Res,1994,54(11):3011-3020.
[35] Rozen P,Shomrat R,Strui H,et al. Prevalence of the I1307K APC gene variant in Israeli Jews of differing ethnic origin and risk for colorectal cancer[J]. Gastroenterology,1999,116(1):54-57.
[36] 刘晓蓉,单祥年,Friedl W,等. 家族性腺瘤样息肉病中 APC 基因的胚系突变分析[J]. 中华医学遗传学杂志,2005,22(3):261-264.

(收稿日期:2014-09-12;修回日期:2014-10-08)
(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)