

丽水市家族性乳腺癌患者 *BRCA1* 基因突变分析

Analysis of *BRCA1* Gene Mutation in Patients with Familial Breast Cancer in Lishui

XIE Yan-ru, WANG Xiao-guang, PAN Ying, et al.

谢艳茹¹, 王晓光², 潘颖¹, 周月芬¹, 陈述政¹

(1. 丽水市中心医院, 浙江大学丽水医院, 温州医学院附属第五医院, 浙江 丽水 323000;

2. 丽水市疾病预防控制中心, 浙江 丽水 323000)

摘要: [目的] 研究丽水市家族性乳腺癌患者 *BRCA1* 基因突变及意义。[方法] 选取丽水市家族性乳腺癌患者 32 例, 其中 5 例为双侧乳腺癌, 抽取入组患者的外周静脉血, 抽提全血基因组 DNA, 应用 PCR 技术对 *BRCA1* 的 22 个外显子基因序列扩增后直接测序。[结果] 32 例家族性乳腺癌患者中共发现 7 例 *BRCA1* 基因突变, 其中 2 例双侧乳腺癌患者检测出 *BRCA1* 基因突变, *BRCA1* 基因突变率为 21.86%, 8 个在 BIC 数据库中均有报道的突变位点。在第 3、11、13 号外显子发生 3 例 4 个位点同义突变, 在第 11、16 号外显子发生 6 例 4 个位点错义突变。突变位点多数位于第 11 号外显子上, 其中有 2 个同义突变、3 个错义突变即 2731C>T、3232A>G、3667A>G。[结论] *BRCA1* 基因突变在丽水市家族性乳腺癌患者中有其自身特点, 研究将为丽水市乳腺癌患者的一级和二级预防提供参考依据。

关键词: 乳腺肿瘤; *BRCA1*; 基因突变

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** B

文章编号: 1671-170X(2015)10-0856-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2015.10.B016

乳腺癌已居女性恶性肿瘤发病之首, 大约 5%~10% 为家族性乳腺癌^[1]。乳腺癌遗传易感基因 *BRCA1* (breast and ovarian cancer susceptibility gene) 突变与家族性乳腺癌关系最为密切^[2-4]。目前研究发现, *BRCA1* 不仅参与 DNA 损伤修复、细胞凋亡、基因转录及细胞周期调控等多种重要细胞活动, 而且在维持基因组稳定性中起重要作用, 其相对表达水平的降低或功能的接替可导致细胞恶性转化和乳腺肿瘤的发生, 使得该基因突变携带者的乳腺癌患病风险明显高于普通人群^[5-7]。国外研究多认同乳腺癌年轻患者突变率高, 且具家族史者携带更多突变位点并较为集中^[8]。为了研究丽水乳腺癌患者中 *BRCA1* 基因的突变情况, 我们对家族性乳腺癌患者 *BRCA1* 基因 22 个外显子序列进行了测定分析, 以了解突变位点在丽水市本地人群中的分布情况。

1 资料与方法

1.1 临床资料

1.1.1 家族性乳腺癌患者标准

家系中至少有 2 个一级或二级亲属患原发性乳腺癌 (包

括研究病例在内), 不论其发病年龄。

1.1.2 患者情况

所有患者均经组织病理证实。中位发病年龄为 35 岁 (24~61 岁), 共收集本院乳腺诊疗中心家族性乳腺癌患者 32 例, 其中 5 例为双侧乳腺癌。本研究均征求每位患者意愿, 同意后方各抽取新鲜外周静脉全血 5ml, 加入 ACD 溶液抗凝, -80℃ 保存备用。

1.2 方法

1.2.1 DNA 纯化

采用 QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, 德国) 抽提全血基因组 DNA, 用紫外分光光度计计算 DNA 的浓度和纯度, 将 DNA 稀释至 100ng/μl, -70℃ 保存备用。

1.2.2 PCR 反应

根据文献和参考 *BRCA1* 全基因组序列 (Accession No: L78833) 并利用软件 Primer Select 和 Primer Premier 5.0 设计扩增 22 个外显子基因序列引物, 引物由生工生物工程 (上海) 公司合成。采用 GoTaq Green Master Mix (Promega, 美国) 进行 PCR 扩增, 反应体系参照试剂盒说明书; PCR 扩增的特异性片段 1.5% 琼脂糖 (OXOID, 英国) 凝胶电泳分离, 用 QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, 德国) 切胶回收并进行序列直接双向测定 (生工生物工程上海公司)。

1.3 基因分析

用生物信息学软件分析处理测序得到的 22 个外显子基因序列和参考序列 (Accession No: U14680)。ATGC Ver4、BioEdit、GENEDOC 进行编辑处理; EditSeq、ATGC、SeqMan 进行序列拼装, Clustalx 进行多序列比对, MegAlign 进行核苷酸与氨基酸突变位点及突变位置的确定。突变位点在 NHGRI (National Human Genome Research Institute) 网站数据库 (BIC, Breast Cancer Information Core Database) 上判定。

2 结果

32 例乳腺癌患者中共发现 7 例 *BRCA1* 基因突变, 其中 2 例 (第 7、18 例) 双侧乳腺癌患者检测出 *BRCA1* 基因突变,

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目 (2011KYA164)

通讯作者: 陈述政, 主任医师, 硕士; 丽水市中心医院乳腺外科, 浙江省丽水市括苍路 289 号 (323000); E-mail: dr.susan@163.com

收稿日期: 2015-03-12; **修回日期:** 2015-07-26

BRCA1 基因突变率为 21.86%, 8 个在 BIC 数据库中均有报道的突变位点, 在第 3、11、13 号外显子发生 3 例 4 个位点同义突变, 在第 11、16 号外显子发生 6 例 4 个位点错义突变 (Table 1、2、Figure 1)。

本研究中 *BRCA1* 基因的突变位点多数位于第 11 号外显子上, 11 号外显子 2201 突变位点 (正常 C), AGC→AGT (S→S)、2430 突变位点 (正常 T), TTG→CTG (L→L)、2731 突变位点 (正常 C), AGC→AGT (S→S)、3232 突变位点 (正常 A), GAA→GGA (E→G)、3667 突变位点 (正常 A), AAA→AGA (K→R); 其中有 2 个同义突变、3 个错义突变即 2731C>T、3232A>G、3667A>G。

3 讨论

1866 年法国外科医生 Paul Broca^[9]首次报道乳腺癌患者家族内聚集现象。20 世纪 70 年代 Lynch 将家族性乳腺癌定义为: 一个家族中一级亲属里有 2 例以上具有乳腺癌病史, 常呈染色体显性遗传, 常伴年轻发病, 或有双侧乳腺癌或有其他脏器重复癌^[10]。1990 年, King 发现, 大约有 20%~25% 的乳腺癌患者至少有一个亲属患有乳腺癌, 他将这部分乳腺癌定义为家族性乳腺癌。也就是说, 在一个家族中有两个具有血缘关系的成员患有乳腺癌, 就可作家族性乳腺癌。英国国

家卫生与临床优化研究所 (NICE) 在 2013 年更新了家族性乳腺癌临床指南中将乳腺癌患者家族的一级和/或二级亲属中有 2 个及 2 个以上患乳腺癌和/或卵巢癌患者, 即可判定为家族性乳腺癌^[11]。而目前国内还没有对家族性乳腺癌作出明确界定, 大部分研究均参考 NICE 中家族性乳腺癌界定标准。

迄今已报道且有详尽研究的乳腺癌易感基因包括 *BRCA1*、*BRCA2*、*CHEK2* 等, 而 *BRCA1* 的突变与家族性乳腺癌密切相关。1990 年, Hall 等^[2]通过对 23 个家族 146 例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*。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, 在不同研究及人群中突变的分布以及各自所占比例的报告差异很大, 在西方人群中有家族史的欧美乳腺癌患者 *BRCA1* 突变率较高, Bergman 等^[12]研究了瑞典 24 例家族性乳腺癌、卵巢癌患者中, *BRCA1* 基因突变率为 75%。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。日

Table 1 Comparison of synonymous mutation sites of *BRCA1* gene in 3 patients

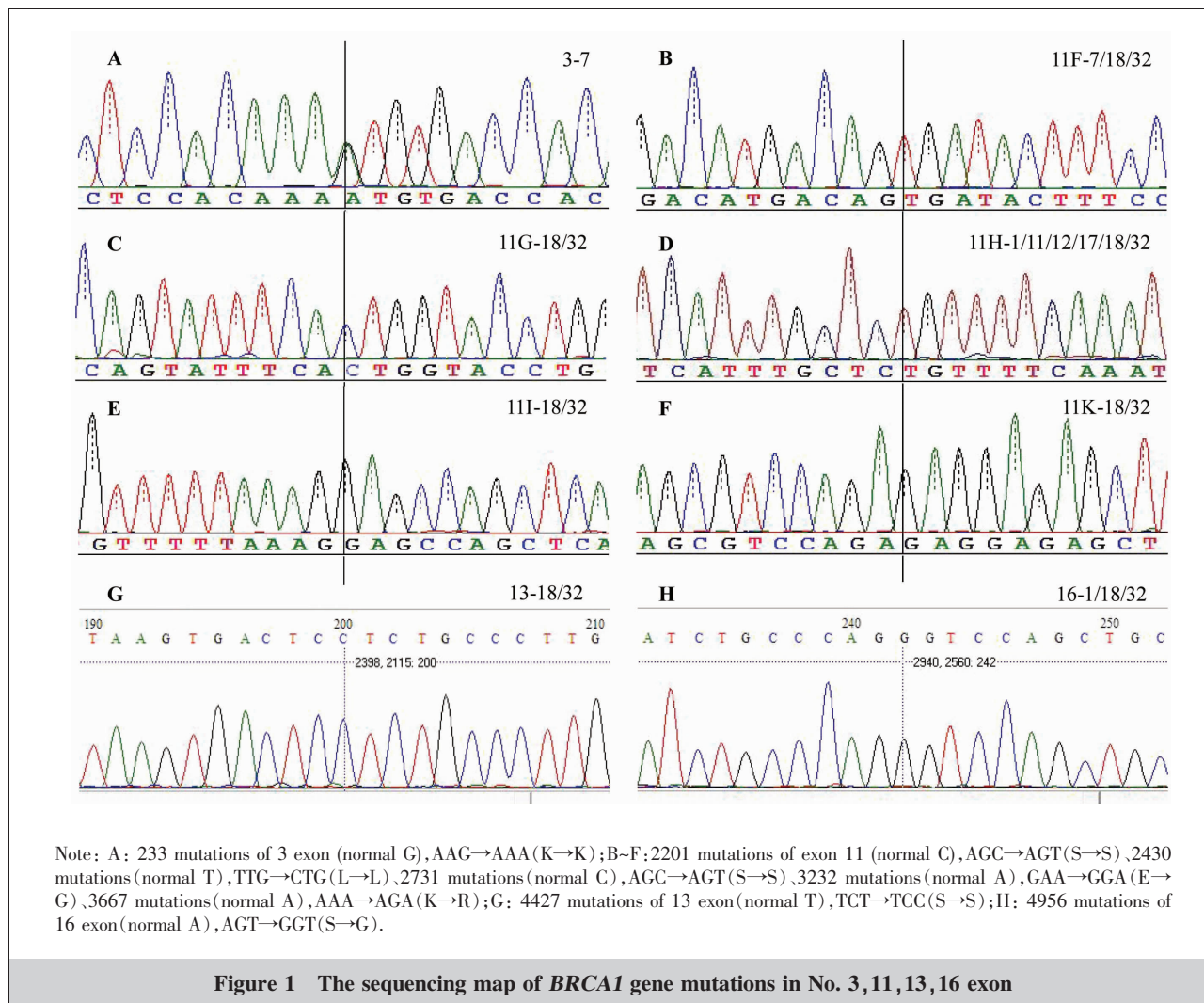
No.	Exon	NT	Codon	Base change	AA Change	BIC designation	Mutation type	Clinically important
7	3	233	38	G to A	Lys to Lys	K38K	Synonymous	No
7	11	2201	694	C to T	Ser to Ser	S694S	Synonymous	Unknown
18	11	2201	694	C to T	Ser to Ser	S694S	Synonymous	Unknown
32	11	2201	694	C to T	Ser to Ser	S694S	Synonymous	Unknown
18	11	2430	771	T to C	Leu to Leu	L771L	Synonymous	Unknown
32	11	2430	771	T to C	Leu to Leu	L771L	Synonymous	Unknown
18	13	4427	1436	T to C	Ser to Ser	S1436S	Synonymous	Unknown
32	13	4427	1436	T to C	Ser to Ser	S1436S	Synonymous	Unknown

Note: a reference sequence was U14680, compared to BIC.

Table 2 Comparison of missense mutation sites of *BRCA1* gene in 6 patients

No.	Exon	NT	Codon	Base Change	AA Change	BIC Designation	Mutation type	Clinically important
1	11	2731	871	C to T	Pro to Leu	P871L	Missense Mutations	No
11	11	2731	871	C to T	Pro to Leu	P871L	Missense Mutations	No
12	11	2731	871	C to T	Pro to Leu	P871L	Missense Mutations	No
17	11	2731	871	C to T	Pro to Leu	P871L	Missense Mutations	No
18	11	2731	871	C to T	Pro to Leu	P871L	Missense Mutations	No
32	11	2731	871	C to T	Pro to Leu	P871L	Missense Mutations	No
18	11	3232	1038	A to G	Glu to Gly	E1038G	Missense Mutations	No
32	11	3232	1038	A to G	Glu to Gly	E1038G	Missense Mutations	No
18	11	3667	1183	A to G	Lys to Arg	K1183R	Missense Mutations	No
32	11	3667	1183	A to G	Lys to Arg	K1183R	Missense Mutations	No
1	16	4956	1613	A to G	Ser to Gly	S1613G	Missense Mutations	No
18	16	4956	1613	A to G	Ser to Gly	S1613G	Missense Mutations	No
32	16	4956	1613	A to G	Ser to Gly	S1613G	Missense Mutations	No

Note: a reference sequence was U14680, compared to BIC.



本学者 Ikeda 等^[13]、Sugano 等^[14]报道的家族性乳腺癌患者 *BRCA1* 的突变率分别为 13.13%、12.6%。我国的研究起步较晚,结果并不一致,同时没有发现中国人群中的“始祖突变”。2006 年宋传贵等^[15]首次研究上海地区 35 例家族性乳腺癌患者 *BRCA1* 基因突变率为 11.4%,2012 年 Zhang 等^[16]研究北京 409 例家族性乳腺癌患者 *BRCA1* 基因突变率为 3.9%,而广东^[17]、山东^[18]、河北^[19]等其他地方研究报道突变率在 4.8%~12.2%。2013 年曹文明等^[20]研究浙江杭州地区家族性乳腺癌 *BRCA1* 基因突变率为 11.3%。本研究中我们检测的 *BRCA1* 基因突变率为 21.86%,高于目前国内报道的研究数据,究其原因可能与双侧乳腺癌的比例较高有关;而且本研究中有 2 例双侧乳腺癌患者均检测出 *BRCA1* 基因突变,提示双侧乳腺癌的发生可能与 *BRCA1* 基因突变有关,尚需扩大样本量进一步研究证实。

到目前为止,已发现数百个 *BRCA1* 突变位点,分布在整个编码区,国内目前关于家族性乳腺癌 *BRCA1/2* 基因突变的研究也在逐渐成熟,发现多个突变位点,但是大部分突变位

点都不同于西方人群的突变热点或始祖突变 (*BRCA1* 的 185delAG、4184del4、5382insC 或 *BRCA2* 的 6174delG)。宋传贵等^[15]关于上海地区家族性乳腺癌 *BRCA1/2* 基因突变的研究发现 *BRCA1*:IVS1721G>T、IVS21+1G>C、1100delAT、5640delA 等致病性突变位点。饶南燕等^[17]关于广东地区家族性乳腺癌患者 *BRCA1* 基因突变的研究发现 1100delAT、331G→A 等突变位点。曹明智等^[18]关于山东地区家族性乳腺癌 *BRCA1* 突变的研究发现 2257C>G、2229delAA、3413delT 等突变位点。李军改等^[19]研究河北省地区家族性乳腺癌发现 2543T>C 无义突变、3180delGG 框移突变、3413delA 框移突变、2229delAA 框移突变等疾病相关性 *BRCA1* 基因突变,均位于第 11 外显子扩增区域上。曹文明等^[20]研究浙江杭州发现了两个新的突变 (3414delC 和 5280 C>T) 和两个回复突变 (5273 G>A 和 5589del8)。本研究中我们发现的 *BRCA1* 基因的突变位点也多数位于第 11 号外显子上,11 号外显子 2201 突变位点 (正常 C),AGC→AGT (S→S)、2430 突变位点 (正常 T),TTG→CTG (L→L)、2731 突变位点 (正常 C),AGC→AGT

(S→S)、3232 突变位点(正常 A),GAA→GGA(E→G)、3667 突变位点(正常 A),AAA→AGA(K→R);其中有 2 个同义突变、3 个错义突变即 2731C>T、3232A>G、3667A>G,与国内相关报道突变位点并不相同,同时这种高频率的突变有可能与丽水地区家族性乳腺癌的发生相关。另外,研究中发现的意义不明的突变,多数是位于编码区的错义突变或同义突变,有可能会改变产物蛋白的构象或生物学功能,需要进一步进行功能分析及家系遗传特征分析来确定其作用。总之,目前国内关于家族性乳腺癌 *BRCA1* 基因突变的研究均未发现中国人群的始祖突变位点,且绝大部分突变位点都比较分散。

家族性乳腺癌高达 40%是由于 *BRCA1* 突变所致。通过不同的乳腺癌分子亚型和肿瘤分类的进展,以及全基因组测序研究和 miRNA 表达谱预测 *BRCA1/2* 突变将是我们未来研究的方向。同时寻找具有相似特征的额外乳腺癌易感基因,包括稀有种系突变的高外显率基因,如 *TP53* 和 *PTEN*,更频繁的突变在温和外显率基因,如 *CHEK2*、*ATM* 和 *PALB2*,都将为乳腺癌的一级和二级预防提供大量机会^[21]。同时根据不同的地理起源、种群或民族的 *BRCA1* 基因突变谱变化,将有助于提供更好的风险评估和乳腺癌的临床管理^[22]。

参考文献:

- [1] Siegel R,Naishadham D,Jemal A. Cancer statistics,2013 [J]. CA Cancer J Clin,2013,63(1):11-30.
- [2] Hall JM, Lee MK, Newman B, et al. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21 [J]. Science, 1990,250(4988):1684-1689.
- [3] 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.
- [4] Couch FJ, Nathanson KL, Offit K. Two decades after *BRCA*: setting paradigms in personalized cancer care and prevention[J]. Science, 2014,343(6178):1466-1470.
- [5] Deng CX. *BRCA1*: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution[J]. Nucleic Acids Research, 2006,34(5):1416-1426.
- [6] De Siervi A, De Luca P, Byun JS, et al. Transcriptional autoregulation by *BRCA1* [J]. Cancer Res, 2010,70(2):532-542.
- [7] Morris JR, Boutell C, Keppler M, et al. The SUMO modification pathway is involved in the *BRCA1* response to genotoxic stress[J]. Nature, 2009,462(7275):886-890.
- [8] Harris JR, Lippman MG, Morrow M, et al. Diseases of the breast(second edition)[M]. Lippincott Williams & Wilkins, 2009.603-617.
- [9] Broca P. Traité des Tumeurs[M]. Paris: Asselin, 1866.
- [10] Lynch HT, Lynch PM, Albano WA, et al. Hereditary cancer: ascertainment and management[J]. CA Cancer J Clin, 1979,29(4):216-232.
- [11] National Collaborating Centre for Cancer(UK). Familial breast cancer: classification and care of people at risk of familial breast cancer and management of breast cancer and related risks in people with a family history of breast cancer [M]. NICE Clinical Guidelines, 164. Cardiff (UK): National Collaborating Centre for Cancer (UK), 2013.
- [12] Bergman A, Flodin A, Engwall Y, 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.
- [13] Ikeda N, Miyoshi Y, Yoneda K, et al. Frequency of *BRCA1* and *BRCA2* germline mutations in Japanese breast cancer families[J]. Int J Cancer, 2001,91(1):83-88.
- [14] Sugano K, Nakamura S, Ando J, et al. Cross-sectional analysis of germline *BRCA1* and *BRCA2* mutations in Japanese patients suspected to have hereditary breast/ovarian cancer[J]. Cancer Sci, 2008,99(10):1967-1976.
- [15] Chuan-Gui Song, Zhen Hu. The prevalence of *BRCA1* and *BRCA2* mutations in eastern Chinese women with breast cancer[J]. Cancer Res Clin Oncol, 2006,132(10):617-626.
- [16] Zhang J, Pei R, Pang Z, et al. Prevalence and characterization of *BRCA1* and *BRCA2* germline mutations in Chinese women with familial breast cancer [J]. Breast Cancer Res Treat, 2012,132(2):421-428.
- [17] Rao NY, Zhou J, Zhao L, et al. *BRCA1* and *BRCA2* deleterious mutation in 219 Han Chinese hereditary breast cancer patients [J]. China Oncology, 2008,18(5):370-375. [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 [J]. 中国癌症杂志, 2008,18(5):370-375.]
- [18] Cao MZ, Ma ZL, Liu XY, et al. Analysis of *BRCA1* mutations among familial and/or breast cancer praecox patients in the east of shandong in China [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2009,9(6):1028-1030. [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):1028-1030.]
- [19] Li JG, Hui TL, Li Z, et al. *BRCA1* and *BRCA2* gene mutations in familial breast cancer[J]. Chinese Journal of Breast Disease(Electronic Edition), 2012,6(6):631-639. [李军改,回天立,李峥,等. 家庭性乳腺癌家系成员乳腺癌易感基因突变的研究[J]. 中华乳腺病杂志(电子版), 2012,6(6):631-639.]
- [20] Cao W, Wang X, Gao Y, et al. *BRCA1* germ-line mutations and tumor characteristics in eastern Chinese women with familial breast cancer[J]. Anat Rec (Hoboken), 2013,296(2):273-278.
- [21] Economopoulou P, Dimitriadis G, Psyrri A. Beyond *BRCA*: New hereditary breast cancer susceptibility genes[J]. Cancer Treat Rev, 2015,41(1):1-8.
- [22] Kwong A, Shin VY, Ho JC, et al. Comprehensive spectrum of *BRCA1* and *BRCA2* deleterious mutations in breast cancer in Asian countries[J]. J Med Genet, 2015,103:132.