doi:10.11659/jjssx.01E017008

·基础研究·

黑斑息肉综合征一家系中 STK11 基因突变研究

王 涛[1],钟敦璟[2],宁琳洪[1],覃 勇[1],郭 红[1] (1.第三军医大学新桥医院消化内科,重庆 400037;2.武警海南总队医院消化内科,海南 海口 570206)

[摘 要] **目的** 检测一个黑斑息肉综合征(PJS)家族的STK11基因突变类型。**方法** 从PJS患者外周血及息肉组织中提取基因组DNA;采用PCR分别扩增STK11基因的9个外显子及非编码区域;采用直接测序法检测DNA序列;采用Western blot检测息肉组织中突变STK11蛋白表达情况。**结果** 该家族中所有PJS患者在STK11基因第5个外显子21位密码子CAG突变为TAG,并编码截短了的STK11蛋白。**结论** STK11基因第5个外显子21位密码子CAG突变为TAG是导致该家族PJS发病的原因,可作为该家族中预诊断PJS的指标,同时该突变也可能导致患者恶性肿瘤发生概率增加以及早期发病,提示PJS患者预后不良。

[关键词] 黑斑息肉综合征;STK11基因;截短突变

[中图分类号] R363.2+1 [文献标识码] A [收稿日期] 2017-01-10

A novel mutation of the STK11 gene in a family with Peutz-Jeghers syndrome

WANG Tao[1], ZHONG Dun-jing[2], NING Lin-hong[1], QING Yong[1], GUO Hong[1] (1. Department of Gastroenterology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China; 2. Department of Gastroenterology, Armed Police Hospital of Hainan, Haikou Hainan 570206, China)

Abstract: Objective To detect the mutation of STK11 in a family with Peutz-Jeghers syndrome. **Methods** Genomic DNA was extracted from peripheral blood and harmatoma polypus of all the patients, and 9 exons and noncoding regions of STK11 were amplified by PCR. Cycle sequencing was used to analysis the DNA sequence, and western blot was used to detected the mutational STK11 protein in the harmatoma polypus. **Results** The 21th codon CAG in exon 5 of STK11 gene transformed to TAG in all the patients, which translated into a truncated STK11 protein. **Conclusion** This novel mutation is the pathogeny of PJS in this family, which could be an indicator for the diagnosis of PJS in this family. And it may lead to a higher risk of cancer in patients.

Keywords: Peutz-Jeghers syndrome; STK11 gene; truncated mutation

黑斑息肉综合征(Peutz-Jeghers syndrome,PJS),又称黑斑胃肠道多发性息肉病,是一种临床上少见的常染色体显性遗传性疾病[1]。PJS以胃肠道多发性错构瘤或腺瘤样息肉,唇周、颊部、肛周、四肢末端皮肤黏膜色素沉着,以及家族史为主要临床特征,腹痛、贫血、急性肠梗阻、肠套叠为其常见并发症[2-4]。PJS息肉有较大癌变概率,并且常伴发其他系统的肿瘤[5-8],患者常因肠梗阻、肠套叠而多次行外科手术治疗,因此,PJS将会严重影响患者存活及生存质量。STK11基因又名LKB1基因,是目前公认的PJS致病基因,于1997年由Hemminkiet等[9]发现,定位于19p 13.3染色体上。STK11基因编码丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(serine/threonine kinase LKB1/STK11),是一种具有抑癌作用的蛋白激酶,STK11/LKB1蛋白激酶的失活可导致包括PJS在内的多种疾病的发生[10]。到目前为止,在PJS患者中发现多种STK11/LKB1的突变,包括错义突变、无义突变、插入突变、缺失突变等[11-13]。不同的基因突变可能通过不同的机制导致疾病发生,PJS的致病机制至今仍未完全阐明。因此进一步筛查STK11基因的突变类型,有助于我们从本质上了解PJS,以期达到治愈该病的目的。为进一步筛查PJS患者STK11基因的突变类型,本研究采集多个PJS患者外周血及息肉组织标本,最终筛选出一个PJS家族,通过基因测序发现了一种未曾报道的STK11基因突变。现报告如下。

[基金项目] 重庆市自然科学基金(CSTC,2009BB5162)

1 资料与方法

1.1 家系选择及样本采集

研究对象纳入标准采用2005年中国抗癌协会临床肿瘤合作中心大会上所达成的PJS诊断标准:①具有消化道2个及以上的错构瘤样息肉;②具有1个消化道错构瘤样息肉并且具有典型的皮肤黏膜色素沉

积。通过筛选,我们找到一个 PJS 家族,在这个家族中,父亲(Ⅱ4)和 2 个女儿(Ⅲ1 和Ⅲ2)被诊断为 PJS(图 1)。通过谱系分析,推测父亲可能发生了基因突变,并遗传给了 2 个女儿。抽取患者外周血,肝素抗凝处理后于 -70 ℃保存。患者通过肠镜行息肉切除,标本保存于液氮中。该研究通过第三军医大学伦理委员会认证,并且所有参与研究的患者均签署知情同意书。

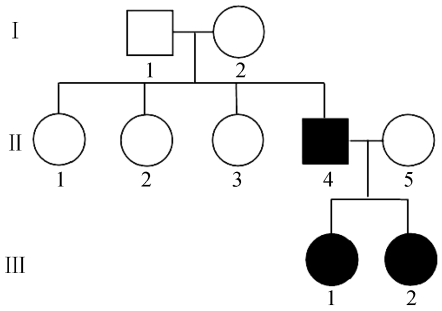


图 1 PJS 家族谱系

1.2 突变基因的检测

使用 DNA 提取试剂盒(Bioflux,中国)从外周血及息肉组织中提取基因组 DNA。使用 primer 5.0 软件设计出 13 个引物并在 Genebank 数据库中检测其特异性,最终通过北京奥科公司合成引物。通过 PCR 来扩增 STK11 基因。大致过程如下:采用德国 Perkin Elmer 公司 9700 型 PCR 仪进行 PCR 扩增。反应条件:95 ℃,2 min;95 ℃,30 s,TM,40 s,72 ℃,50 s,40 个循环;72 ℃,5 min。扩增产物通过 2% 琼脂胶电泳检测扩增效果,并用 PCR 产物萃取试剂盒纯化。纯化后的 PCR 扩增产物使用 ABI 3700 型 DNA 测序仪(Perkin Elmer 公司)测序,测序反应用 ABI PRISMTM Big-Dye 循环反应测序试剂盒进行荧光标记,反应所用引物同 PCR 反应引物。反应条件:96 ℃ 10 s,96 ℃ 10 s,60 ℃ 5 s,60 ℃ 4 min,33 个循环;60 ℃ 4 min。测序结果使用 DNASTAR 软件分析,并与 NCBI 数据库(http://www.Ncbi.Nlm.nih.Gov)中 STK11 基因标准序列(NT_011255.14 GI:37552371 REGION:1128821-1185411)做序列比对分析。

1.3 Western blot 分析

大致过程如下:常规研磨组织标本,使用 RIPA 裂解液提取总蛋白。使用 BCA 法进行蛋白定量,沸水煮 5 min 使蛋白变性,10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白,通过电转将蛋白印迹转至 NC 膜上,5% 脱脂奶粉溶液封闭,特异性 STK11 蛋白抗体(一抗)及羊抗兔 IgG(二抗)孵育,ECL 化学显色曝光。

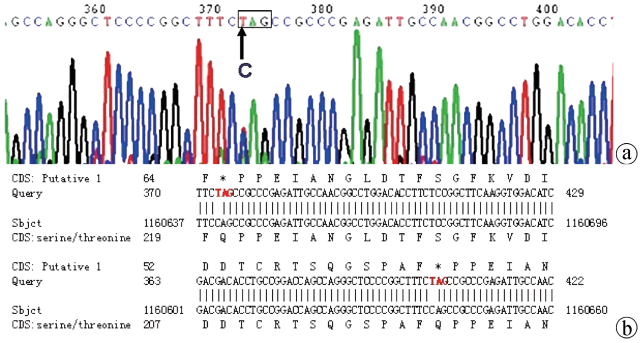
1.4 STK11 蛋白结构预测

使用同源建模程序 SWISS-MODEL(http://swiss-model.expasy.org//SWISS-MODEL.html)和 CPHmodels(http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/)来构建蛋白结构。

2 结果

2.1 发现 STK11 基因新的截短突变

我们分析该家族中 PJS 患者,健康家族成员以及家族外其他散发肠息肉患者的外周血 STK11 基因序列,发现该家族中所有 PJS 患者(父亲及 2 个女儿Ⅱ4,Ⅲ1,Ⅲ2)的 STK11 基因的第 657 个碱基胞嘧啶(C)突变成了胸腺嘧啶(T),该突变发生在第 5 个外显子的 21 位密码子(图 2a)。而其他健康家族成员及家族外散发肠息肉患者中则未发现该突变。同时从患者息肉组织中提取出的 DNA,我们也发现相同的 STK11 基因的突变(图 2b)。我们进一步分析 STK11 基因的非编码区域,包括启动子区域及 3'-5' 非编码区域,并未发现任何基因突变。

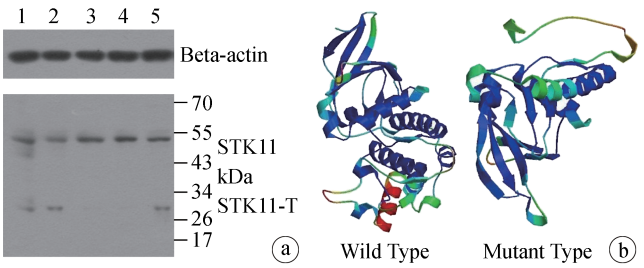


a:PJS 患者外周血的 DNA 序列(黑色箭头部位为突变位点);b:PJS患者息肉组织的 DNA 序列(红色部分为突变位点)

图 2 STK11 基因的终止突变

2.2 突变的 STK11 基因编码截短蛋白

由于在 STK11 基因第 5 号外显子的 21 位密码子 CAG 突变为 TAG(图 2),该密码子为终止密码子,这种突变类型将导致基因编码提前终止,因此我们推测这种突变基因将编码一种截短的 STK11 蛋白。通过 Western blot 实验,我们在 PJS 患者息肉组织中发现了与我们推测相符的 STK11 蛋白(STK11-T),这种截短的蛋白大小在 30 kDa 左右,而正常的 STK11 蛋白大小在 55 kDa 左右(图 3a)。进一步通过网站预测该突变蛋白的结构,我们发现与正常 STK11 蛋白相比,突变的 STK11 蛋白的部分激酶催化区域缺失,C-末端完全缺失(图 3b)。



a:Western blot 检测 PJS 患者(1、2、5)及健康者(3、4)的息肉组织 STK11 蛋白(STK11-T 为突变蛋白,STK11 为正常蛋白);b:网站预测野生型(Wild Type)及突变型(Mutant Type)STK11 蛋白结构(红色部分为 C-末端,绿色为 N-末端,蓝色为激酶催化区域)

图 3 突变 STK11 基因编码截短蛋白

3 讨论

STK11 基因分布在 23 kb 的 gDNA 区域,cDNA 全长 2 155 bp,编码区长约 1 302 bp,含 9 个外显子。目前在 PJS 与其他疾病发现的 STK11 基因突变类型已达 300 余种。在 PJS 患者中,STK11 基因的突变率达 57% ~ 88%[14-17]。该基因编码含 433 个氨基酸的 STK11/LKB1 蛋白激酶,包括 3 个结构域:N-末端非催化区域,激酶催化区域以及 C-末端非催化调控区域[18],作为一种高度保守的蛋白,其结构发生变化将严重影响其功能。

本研究在一个 PJS 家族中发现一种新的 STK11 突变:5 号外显子的第 21 位密码子 CAG 突变为 TAG,该突变导致 STK11 基因编码蛋白提前终止,最终导致 STK11/LKB1 蛋白的激酶催化区域部分缺失及 C-末端完全缺失。类似的 STK11 基因截短突变在其他研究中亦有发现[13,19-20],其中一种发生在第 7 号外显子的 302 位密码子的突变(CAG→TAG)同样导致了 STK11/LKB1 蛋白的激酶催化区域部分缺失及 C-末端完全缺失。并且,该研究发现这种截短突变的 PJS 患者更容易发生恶性肿瘤[19],而本研究中起始突变患者(父亲Ⅱ4)已死于肠道息肉癌变。因此,我们推测该类型的截短突变将导致患者恶性肿瘤发生概率增加。

然而,关于 STK11 基因突变类型与恶性肿瘤发生风险的关系目前尚存在争论。一项针对 240 例携带突变的 STK11 基因的 PJS 患者研究表明,发生 STK11 基因错义突变的患者比截短突变的患者更容易发生恶性肿瘤,同时研究者发现当 STK11 基因突变位于第 3 号外显子时患者具有更高的恶性肿瘤风险[21]。而另一项对 419 例 PJS 患者的研究则表明 PJS 患者发生恶性肿瘤的风险与 STK11 的基因突变类型无明显关系[8]。

STK11/LKB1 蛋白激酶作为一种抑癌因子在肿瘤发生过程中的多个方面起作用[10]。本研究发现的截断突变导致 STK11/LKB1 蛋白激酶 C-末端完全缺失,而 STK11/LKB1 蛋白激酶 C-末端是与 STARD 蛋白结合的关键结构,STARD 蛋白作为 MAPK 信号通路的重要组成蛋白,在调控细胞极性和代谢中起关键作用[22-23]。因此,我们认为在此种类型的突变中,STK11/LKB1 蛋白 C-末端缺失可能是导致患者更容易发生恶性肿瘤的主要原因。另外,与肿瘤发生相关的多种蛋白如 p53、Cdc37、Hsp90、PTEN 等都与 STK11/LKB1 蛋白激酶存在相互作用,但具体机制仍不明确[24]。我们推测上述的某种蛋白与 STK11 相互作用的区域可能定位在本研究发现的突变的 5 号外显子的第 21 位密码子区域,这种突变就导致患者更容易发生恶性肿瘤。基于以上分析,尽管既往文献对 STK11 基因突变类型与恶性肿瘤发生关系尚未明确定论,我们认为本研究发现的截短突变,5 号外显子的第 21 位密码子 CAG 突变为 TAG,可能导致患者发生恶性肿瘤的概率增高,其中 STK11/LKB1 蛋白 C-末端缺失在其中可能起着重要作用,但具体机制仍需更多的研究来证实。

PJS 患者常因肠梗阻、肠套叠等并发症而多次行外科手术治疗,发病年龄越早的患者手术的次数越多,其生存质量就越差。有文献报道,STK11 基因的截短突变将导致 PJS 患者更早地出现临床表现,如黑斑、胃肠道息肉以及相关的胃肠道并发症[13,20]。本研究中的 PJS 家族中 2 个患者(2 个女儿,Ⅲ1、Ⅲ2)出现消化道症状的年龄均小于文献报道的中位发病年龄(13 岁)[25-26]。因此本研究发现的 STK11 基因的截短突变也提示着患者可能会更早发病并且具有较差的预后。

本研究中发现的 STK11 基因突变,5 号外显子的第 21 位密码子 CAG 突变为 TAG,是导致该家族中发生 PJS 的原因。该基因突变在该家族患者中均有发生,而在其他家族健康成员中均未发现,因此,该突变可作为该家族中预诊断 PJS 的指标。同时,该突变也可能导致患者恶性肿瘤发生的概率增加以及早期发病,提示 PJS 患者预后不良。

[参考文献]

[1] Jeghers H,Mckusick VA,Katz KH. Generalized intestinal polyposis and melanin spots of the oral mucosa,lips and digits;a syndrome of diagnos-

tic significance[J]. N Engl J Med,1949,241(26):993. doi:10.1056/NEJM194912222412501.

[2] Christiansen E,Nielsen R. Gastrointestinal bleeding and intussusception caused by Peutz-Jeghers syndrome[J]. Ugeskr Laeg,2011,173(44):2800 - 2801.

[3] Idrogo Regalado B,Frisancho Velarde O. Peutz Jeghers syndrome. Report of five cases[J]. Rev Gastroenterol Peru,2016,36(2):165 - 168.

[4] Ogura T,Ishiguro T,Muta Y,et al. A family with Peutz-Jeghers syndrome having various malignant diseases[J]. Gan To Kagaku Ryoho,2016,43(12):2133 - 2135.

[5] Boardman LA,Thibodeau SN,Schaid DJ,et al. Increased risk for cancer in patients with the Peutz-Jeghers syndrome[J]. Ann Intern Med,1998,128(11):896 - 899. doi:10.7326/0003 - 4819 - 128 - 11 - 199806010 - 00004.

[6] Van Lier MG,Westerman AM,Wagner A,et al. High cancer risk and increased mortality in patients with Peutz-Jeghers syndrome[J]. Gut,2011,60(2):141 - 147. doi:10.1136/gut.2010.223750.

[7] Giardiello FM,Brensinger JD,Tersmette AC,et al. Very high risk of cancer in familial Peutz-Jeghers syndrome[J]. Gastroenterology,2000,119(6):1447 - 1453. doi:10.1053/gast.2000.20228.

[8] Hearle N,Schumacher V,Menko FH,et al. Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome[J]. Clin Cancer Res,2006,12(10):3209 - 3215. doi:10.1158/1078 - 0432.CCR - 06 - 0083.

[9] Hemminki A,Markie D,Tomlinson I,et al. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome[J]. Nature,1998,391(6663):184 - 187. doi:10.1038/34432.

[10] Korsse SE,Peppelenbosch MP,van Veelen W. Targeting LKB1 signaling in cancer[J]. Biochim Biophys Acta,2013,1835(2):194 - 210. doi:10.1016/j.bbcan.2012.12.006.

[11] Jenne DE,Reimann H,Nezu J,et al. Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase[J]. Nat Genet,1998,18(1):38 - 43. doi:10.1038/ng0198 - 38.

[12] Launonen V. Mutations in the human LKB1/STK11 gene[J]. Hum Mutat,2005,26(4):291 - 297. doi:10.1002/humu.20222.

[13] Tan H,Mei L,Huang Y,et al. Three novel mutations of STK11 gene in Chinese patients with Peutz-Jeghers syndrome[J]. BMC Med Genet,2016,17(1):77. doi:10.1186/s12881 - 016 - 0339 - 6.

[14] Weng MT,Ni YH,Su YN,et al. Clinical and genetic analysis of Peutz-Jeghers syndrome patients in Taiwan[J]. J Formos Med Assoc,2010,109(5):354 - 361. doi:10.1016/S0929 - 6646(10)60063 - 0.

[15] Orellana P,López-Köstner F,Heine C,et al. Large deletions and splicing-site mutations in the STK11 gene in Peutz-Jeghers Chilean families[J]. Clin Genet,2013,83(4):365 - 369. doi:10.1111/j.1399 - 0004.2012.01928.x.

[16] Volikos E,Robinson J,Aittomäki K,et al. LKB1 exonic and whole gene deletions are a common cause of Peutz-Jeghers syndrome[J]. J Med Genet,2006,43(5):e18. doi:10.1136/jmg.2005.039875.

[17] Aretz S,Stienen D,Uhlhaas S,et al. High proportion of large genomic STK11 deletions in Peutz-Jeghers syndrome[J]. Hum Mutat,2005,26(6):513 - 519. doi:10.1002/humu.20253.

[18] Hanks SK,Quinn AM,Hunter T. The protein kinase family:conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains[J]. Science,1988,241(4861):42 - 52. doi:10.1126/science.3291115.

[19] Wang Z,Chen Y,Wu B,et al. A novel mutation in STK11 gene is associated with Peutz-Jeghers syndrome in Chinese patients[J]. BMC Med Genet,2011,12:161. doi:10.1186/1471 - 2350 - 12 - 161.

[20] Chen JH,Zheng JJ,Guo Q,et al. A novel mutation in the STK11 gene causes heritable Peutz-Jeghers syndrome-a case report[J]. BMC Med Genet,2017,18(1):19. doi:10.1186/s12881 - 017 - 0373 - z.

[21] Lim W,Olschwang S,Keller JJ,et al. Relative frequency and morphology of cancers in STK11 mutation carriers[J]. Gastroenterology,2004,126(7):1788 - 1794. doi:10.1053/j.gastro.2004.03.014.

[22] Baas AF,Kuipers J,van der Wel NN,et al. Complete polarization of single intestinal epithelial cells upon activation of LKB1 by STRAD[J]. Cell,2004,116(3):457 - 466. doi:10.1016/s0092 - 8674(04)00114 - x.

[23] Forcet C,Etienne-Manneville S,Gaude H,et al. Functional analysis of Peutz-Jeghers mutations reveals that the LKB1 C-terminal region exerts a crucial role in regulating both the AMPK pathway and the cell polarity[J]. Hum Mol Genet,2005,14(10):1283 - 1292. doi:10.1093/hmg/ddi139.

[24] Mehenni H,Resta N,Park JG,et al. Cancer risks in LKB1 germline mutation carriers[J]. Gut,2006,55(7):984 - 990. doi:10.1136/gut.2005.082990.

[25] Westerman AM,Entius MM,de Baar E,et al. Peutz-Jeghers syndrome:78-year follow-up of the original family[J]. Lancet,1999,353(9160):1211 - 1215. doi:10.1016/s0140 - 6736(98)08018 - 0.

[26] Amos CI,Keitheri-Cheteri MB,Sabripour M,et al. Genotype-phenotype correlations in Peutz-Jeghers syndrome[J]. J Med Genet,2004,41(5):327 - 333. doi:10.1136/jmg.2003.010900.

(编辑:魏 源)