

视网膜母细胞瘤蛋白磷酸激酶 2A 亚基外显子基因突变的研究

王 慧,李永蓉,纪风涛,王志敏

基金项目:安徽省科技攻关项目(No. 15011d04057)

作者单位:(230011)中国安徽省合肥市第二人民医院广德路院区眼科

作者简介:王慧,女,毕业于苏州大学医学院,硕士研究生,主治医师,研究方向:白内障的基础及临床研究。

通讯作者:王慧. wanghuilx@163.com

收稿日期:2017-03-28 修回日期:2017-08-07

Investigation on the mutation of PPP2R3A exons in retinoblastoma

Hui Wang, Yong - Rong Li, Feng - Tao Ji, Zhi - Min Wang

Foundation item: Anhui Province Science and Technology Project (No. 15011d04057)

Department of Ophthalmology, Guangde Road Branch, the Second People's Hospital of Hefei, Hefei 230011, Anhui Province, China

Correspondence to: Hui Wang. Department of Ophthalmology, Guangde Road Branch, the Second People's Hospital of Hefei, Hefei 230011, Anhui Province, China. wanghuilx@163.com

Received:2017-03-28 Accepted:2017-08-07

Abstract

• AIM: To explore the association of the mutation in PPP2R3A exons and retinoblastoma.

• METHODS: Hospital - based case control study was taken. Retinoblastoma patients (15 cases, as case group) and matched controls (30 controls, as control group) were recruited in this study. Genomic DNA obtained from formalin fixed paraffin embedded (FFPE) and peripheral blood were used as template. PPP2R3A gene exon sequences were detected by PCR-sequencing. Homology analysis was performed using blastn in GenBank.

• RESULTS: Analyzing PPP2R3A DNA sequences (1001bp) from 15 cases, two reported SNPs had been detected, including rs34629706 and rs144802055. Rs34629706 also occurred in the control group. Rs144802055 appeared only in the case group.

• CONCLUSION: PPP2R3A gene SNPs of rs34629706 is unrelated to the incidence of retinoblastoma. Relations between rs144802055 and RB needs to be further explored.

• KEYWORDS: retinoblastoma; PPP2R3A exons; gene mutation; single nucleotide polymorphisms

Citation: Wang H, Li YR, Ji FT, et al. Investigation on the mutation of PPP2R3A exons in retinoblastoma. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2017;17(9):1727-1730

摘要

目的:探讨蛋白磷酸激酶 2A 亚基(PPP2R3A)基因外显子序列突变与视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, RB)的关系。方法:选择视网膜母细胞瘤患者 15 例(病例组)及正常的对照 30 例(对照组),以病理蜡块组织和外周血基因组为模板,通过聚合酶链反应(polymerase Chain Reaction, PCR)扩增 PPP2R3A 基因的外显子,并将 PCR 产物纯化后测序。测序结果与 GenBank 公布的 PPP2R3A 基因正常序列进行比对。

结果:病例组在 PPP2R3A 基因的 1001bp 外显子序列中发现两个单核苷酸多态性(SNPs),即 rs34629706 和 rs144802055。rs34629706 亦在对照组中出现。rs144802055 仅出现于病例组中。

结论:PPP2R3A 基因 SNPs 位点 rs34629706 与 RB 的发病无关。rs144802055 位点与 RB 的关系有待进一步探讨。

关键词:视网膜母细胞瘤;蛋白磷酸激酶 2A 亚基外显子;基因突变;单核苷酸多态性

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2017.9.31

引用:王慧,李永蓉,纪风涛,等. 视网膜母细胞瘤蛋白磷酸激酶 2A 亚基外显子基因突变的研究. 国际眼科杂志 2017;17(9):1727-1730

0 引言

视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, RB)是一种原发于婴幼儿时期视网膜上的眼内恶性肿瘤^[1-2]。对儿童视功能的危害极大,容易发生转移导致患儿的死亡,是眼部肿瘤的研究热点^[3-5]。因此探讨视网膜母细胞瘤的发病机制至关重要^[6-7]。蛋白磷酸激酶 2A (protein phosphatase 2A, PP2A)是真核细胞内广泛表达的 Ser/Thr 蛋白磷酸酶家族成员之一,通过去磷酸化作用参与细胞生物过程中关键调控蛋白的可逆磷酸化,进而拮抗绝大多数 Ser/Thr 蛋白激酶的活性^[8-11]。研究表明 PP2A 不同亚基在人类细胞转化和多阶段致癌过程中起重要作用^[12-14]。已有报道其中的亚基 PP2A-A α 基因(PPP2R1A)在乳腺癌、结肠癌等细胞内基因编码区存在遗传变异^[15]。B 亚基(PPP2R3A)基因与 RB 的发生是否存在一定的关联值得我们进一步研究,本研究探讨 PPP2R3A 基因外显子突变与 RB 的关系。

表1 PPP2A3R 基因外显子 1、2、3 扩增引物序列

引物名称	外显子	引物序列	产物长度(bp)	退火温度(°C)
PPP2R3A-1F	Exon1	5'-GTCTCATAGAACTCACTGG-3'	407	58
PPP2R3A-1R		5'-AGAAGGGAGTCAGTTGTAAG-3'		
PPP2R3A-2F	Exon2	5'-AAGCATTCCCTAGAAACATG-3'	460	55
PPP2R3A-2R		5'-AAGGGGAGATTGTAATCAT-3'		
PPP2R3A-3F	Exon3	5'-TTTCCCCTCTGCCTCTCTCT-3'	344	60
PPP2R3A-3R		5'-TCATGAGGGTCACACAATTCT-3'		

1 对象和方法

1.1 对象 收集 2009-01/2014-09 就诊于合肥市第二人民医院眼科和苏州大学附属第二医院眼科中心并确诊的 RB 患儿 15 例为病例组,包括眼肿瘤蜡块组织 7 例和外周血 8 例;正常对照组 20 例,包括正常眼组织 20 例(引产胎儿)和正常幼儿的外周血 10 例。本研究经医院医学伦理委员会批准,符合医学伦理学原则。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 石蜡组织切片 DNA 的提取采用 QIAamp DNA FFPE Tissue Kit 试剂盒,外周血 DNA 的提取采用 QIAamp DNA Blood Mini Kit 试剂盒。按照说明书提取 DNA 后测量基因组 DNA 的 OD 值和浓度,基因组 DNA OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值均为 1.6~1.95,浓度为 10~60ng/μL。分别取石蜡组织切片 DNA 5μL 和血液 DNA 2μL 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,电泳条带单一(图 1)。基因组 DNA 于 -20°C 保存备用。

1.2.2 引物设计及 PCR 扩增 设计三对引物扩增 PPP2R3A 基因的 1、2、3 外显子,引物由上海生工生物工程有限公司合成,PCR 扩增引物序列见表 1。PCR 扩增反应体系为 20μL,包括 1μL 模板 DNA (10~60ng/μL),2.0μL 10×PCR Buffer,1.2μL MgCl₂ (25mmol/L),0.2μL dNTP (10mmol/L),0.2μL Tag 酶 (5U/μL),0.4μL 引物 (10pmol/μL),15μL ddH₂O。使用 9700 PCR 仪进行 PCR 反应(ABI 公司),反应程序为:95°C 5min;94°C 45s;退火温度 45s;72°C 45s,共 39 个循环;72°C 5min 后终止反应。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,条带均单一(图 2)。扩增产物按照 PCR 产物回收试剂盒(Axygen)说明书的操作步骤进行回收纯化。

1.2.3 测序 纯化产物均经测序仪器 3730XL (BigDye Version3.1, Applied Biosystems) 双向测序,测序方法为 Sanger 双脱氧链终止法。

1.2.4 单核苷酸多态性分析 采用 Dnasp4.5 软件进行单核苷酸多态性(SNPs)分析^[16]。

2 结果

2.1 基因 PPP2R3A 外显子的单核苷酸多态性分析 在检测 1001bp 的 PPP2R3A 基因的外显子序列中共发现 2 个 SNPs 位点,均为单碱基的替换。病例组发现 2 个 SNPs:rs34629706、rs144802055;对照组发现 1 个 SNPs 位点:rs34629706,见表 2。

2.2 测序结果分析 进一步分析出现的单核苷酸多态性位点,发现检测到的两个 SNPs 位点外文文献已有报道(表 3)。其中位点 rs34629706 的突变是 NM_002718.4:c.696C>T,p.Cys232=,氨基酸不发生改变。未检测到完全

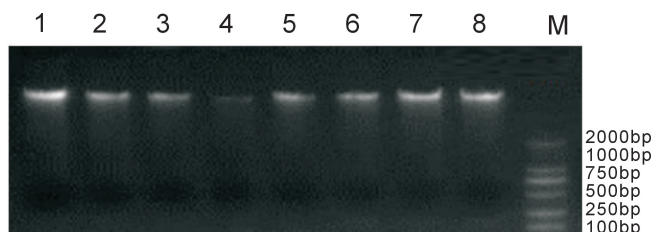


图1 基因组电泳图 1~8:石蜡组织切片和外周血提取的 DNA 样本(182237bp)。

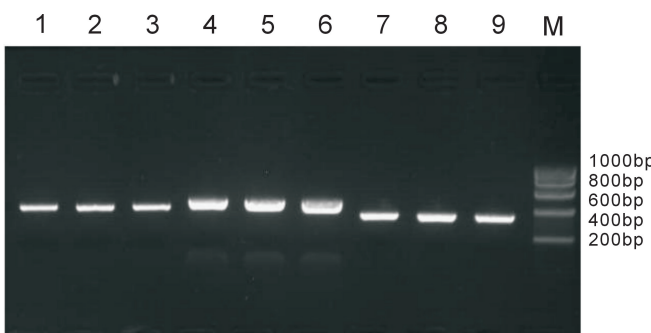


图2 PPP2A3R 基因扩增电泳图 1~3:外显子 1(407bp); 4~6:外显子 2(460bp);7~9:外显子 3(344bp)。

的由野生型 C 到突变型 T 的变化,而是以杂合子的形式存在(图 3);另一位点 rs144802055 的突变是 NM_002718.4:c.721G>A,p.Glu241Lys,氨基酸发生改变。在已经检测发现的突变中,没有出现由野生型 G 到突变型 A 的纯化突变,同样是以杂合子的形式出现(图 4)。值得引起注意的是位点 rs144802055 的突变仅在病例组中发现,在正常的对照组中并没有检测到纯合突变和杂合突变。

3 讨论

PP2A 在物质代谢、基因表达、DNA 复制与损伤修复、人类细胞转化和肿瘤发生发展中具有重要作用,参与致癌过程中细胞的诱导性转化及调控,被认为是一个潜在的肿瘤抑制因子^[9-10]。PP2A 全酶是一个三聚体,由催化亚基 C、结构亚基 A 和调节亚基 B 组成,其中 A 和 C 亚基构成酶的核心二聚体,在各种类型的细胞中广泛存在,具有一定的保守性,而亚基 B 则具有组织和发育专一性,变异性很强^[11]。已经有报道分析了 B 亚基 PPP2R3A 基因在正常人中的多态性^[16],发现在广东的汉族人群中存在 4 个遗传变异位点;同时也有报道 PPP2R5C 基因启动子区的多态性和人群分布,结果显示人群中存在 5 个遗传变异位点^[17]。但未见探讨 PPP2R3A 基因在中国人群中的多态性分析。多年研究发现视网膜母细胞瘤的发生与基因 Rb 的突变密切相关,其表达的 RB 蛋白调节多种与细胞增生

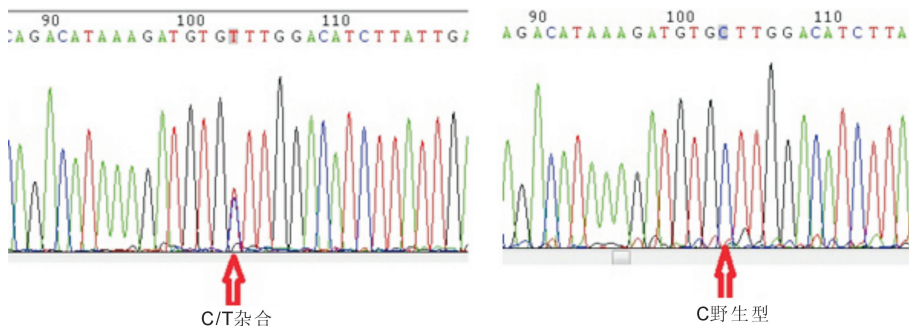


图3 rs34629706 位点的基因型。

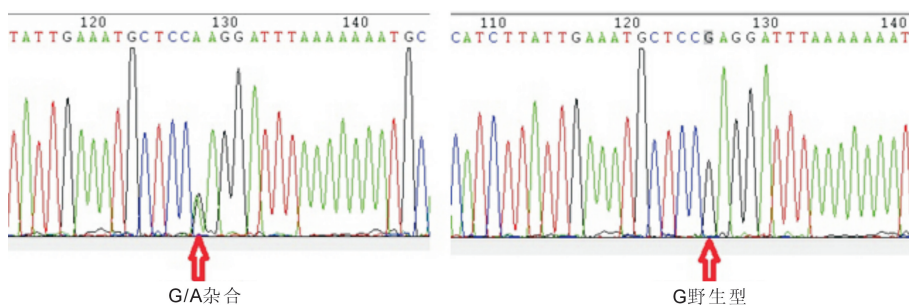


图4 rs144802055 位点的基因型。

表2 PPP2R3A 基因外显子的单核苷酸多态性分析

位点	长度(bp)	病例组		对照组		合计	
		S	θ_w	S	θ_w	S	θ_w
PPP2R3A-1	342	2	0.00180	1	0.00074	2	0.00134
PPP2R3A-2	379	0	0	0	0	0	0
PPP2R3A-3	280	0	0	0	0	0	0

注:S:位点数; θ_w :群体内所有同源 DNA 序列上每个位点的平均杂合度(或称为平均多样性)。

表3 PPP2R3A 基因外显子突变的结果

遗传变异位点	染色体序列位置	SNPs 登录号	病例组突变基因型	对照组突变基因型
C-T	136002194	rs34629706	C/T 杂合	C/T 杂合
G-A	136002219	rs144802055	G/A 杂合	—

有关的基因转录,并最终影响细胞周期的过程。磷酸化的 RB 蛋白失去应有的生物学活性,无法实现对细胞增殖的负反馈调节,最终导致视网膜母细胞瘤的发生。PP2A 参与 RB 蛋白的去磷酸化过程,使其恢复活性,抑制细胞增生^[9]。

本研究选择 PP2A 中 B 亚基基因 PPP2R3A 基因,检测其在 RB 患儿和正常人中的遗传变异,检测 1、2、3 号外显子发现两个已经报道的 SNPs 位点 rs34629706、rs144802055,其中引起氨基酸改变的 rs144802055 位点在我们检测中仅出现在病例组中,该位点的突变与 RB 的发生存在一定联系。该位点突变是以杂合的形式存在,也就是仅仅是部分氨基酸发生了改变,鉴于我们本次研究样本量有限,在正常的对照组中没有检测到该位点的突变型基因,我们推测可能是由于杂合中野生型的部分属于正常的细胞组织。目前检测的外显子区域有限,尚不能说明问题的本质,但至少从基因遗传变异的角度为探讨 RB 的发生提供了一定的参考意义。要进一步探讨 RB 的致病基因,除进一步扩大样本量、选取多基因多位点进行相关研究外,我们实验室下一步准备进行基因的启动子及外显子的

全序检测,以最终阐明 PPP2R3A 基因与视网膜母细胞瘤发病的关系。

参考文献

- 葛坚. 眼科学. 北京:人民卫生出版社 2005:214
- Gatta G, Capocaccia R, Coleman MP, et al. Childhood cancer survival in Europe and United States. *Cancer* 2002;95(8):1767-1772
- Cimino PJ, Robirds DH, Tripp SR, et al. Retinoblastoma gene mutations detected by whole exome sequencing of Merkel cell carcinoma. *Mod Pathol* 2014;27(8):1073-1087
- Orjuela MA, Cabrera-Muñoz L, Paul L, et al. Risk of retinoblastoma is associated with a maternal polymorphism in dihydrofolatereductase (DHFR) and prenatal folic acid intake. *Cancer* 2012; 118(23): 5912-5919
- Livide G, Epistolato MC, Amenduni M, et al. Epigenetic and copy number variation analysis in retinoblastoma by MS-MLPA. *Ariani F Pathol Oncol Res* 2012;18(3):703-712
- Heck JE, Lombardi CA, Meyers TJ, et al. Perinatal characteristics and retinoblastoma. *Cancer Causes Control* 2012;23(9):1567-1575
- Bunin GR, Tseng M, Li Y, et al. Parental diet and risk of retinoblastoma resulting from new germline RB1 mutation. *Environ Mol Mutagen* 2012; 53(6):451-461

8 Zolnierowicz S. Type 2A protein phosphatase. The complex regulator of numerous signaling pathway. *Biochem Pharmacol* 2000; 60 (8): 1225-1235

9 Schonthal AH. Role of serine/threonine protein phosphatase 2A in cancer. *Cancer Lett* 2001;170(1):1-13

10 Millward TA, Zolnierowicz S, Hemmings BA, *et al.* Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends Biodvem Sci* 1999;24(5):186-191

11 Wang SS, Esplin ED, Li JL, *et al.* Alterrations of the PPP2R1B gene in human lung and colon cancer. *Science* 1998;282(5387):284-287

12 Calin GA, di Iasio MG, Caprini E, *et al.* Low frequency of alterations of the alpha (PPP2R1A) and beta (PPP2R1B) isoforms of the submit A of the serine-threonine phosphatase 2A in human neoplasms. *Oncogene* 2000;19(9):1191-1195

13 Hendrix P, Mayer-Jackel RE, Cron P, *et al.* Structure and expression

of a 72-kDa regulatory subunit of protein phosphatase 2A. Evidence for different size forms produced by alternative splicing. *Biol Chem* 1993; 268(20):15267-15276

14 Davis AJ, Yan Z, Martinez B, *et al.* Protein phosphatase 2A is targeted to cell division control protein 6 by a calcium-binding regulatory subunit. *Biol Chem (United States)* 2008;283(23):16104-16114

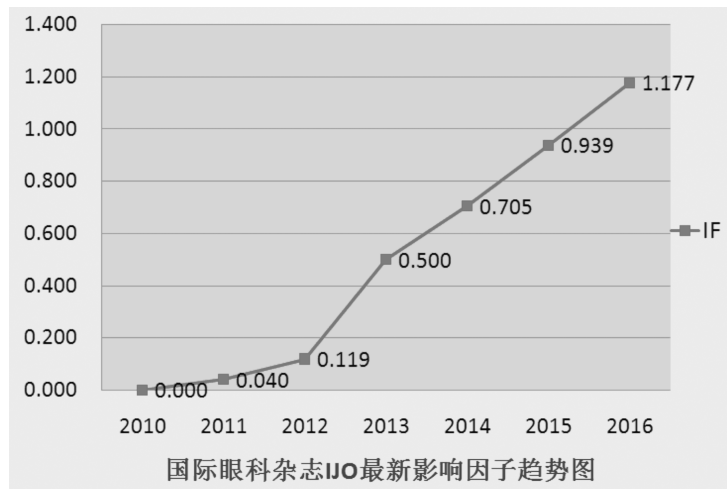
15 陈慧峰, 罗洁, 林丽娜, 等. 蛋白磷酸激酶2A-A α 亚基基因5'侧翼区多态性在广东汉族人群中的分布. *癌变·畸变·突变* 2011;23(2):93-97

16 Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X, *et al.* DnaSP DNA polymorphism analyses by coalescent and other methods. *Bioinformatics* 2003;19(18):2496-2497

17 林育纯, 陈慧峰, 陈宇曦, 等. 75例广东籍汉族人蛋白磷酸激酶2A-B56y亚基基因5'侧翼区多态性分析. *中国职业医学* 2011;38(1):8-12

热烈祝贺 IJO 最新影响因子达到 1.177

2016年SCI JCR影响因子正式出炉,《国际眼科杂志》英文刊IJO最新影响因子为1.177,趋势图如下:



源自:汤森路透官网