

MEN II A 综合征家系的 RET 原癌基因突变及其临床意义

骆杰伟 陈慧 朱庆国 伍严安 王仪 黄慧芳

【摘要】 目的 筛查 1 个 MEN-II A 综合征家系的 RET 原癌基因突变位点,用于指导临床。方法 对 1 个 MEN-II A 综合征家系的 5 个成员外周血提取 DNA,采用聚合酶链反应和 DNA 直接测序方法进行 RET 基因热点突变的第 10、11 外显子检测,并讨论 MEN-II A 家系基因突变早期检测对预防性选择外科治疗的指导意义。结果 第 11 外显子 634 密码子存在 TGC→CGC 突变,编码的氨基酸由 Cys(半胱氨酸)变为 Arg(精氨酸)。结论 MEN-II A 综合征的早期基因诊断意义较大。

【关键词】 多发性内分泌腺瘤病 II A 型;嗜铬细胞瘤;甲状腺髓样癌;RET 原癌基因;突变

Analysis of mutation detection of RET proto-oncogene in a family with multiple endocrine neoplasia type II A syndrome LUO Jie-wei¹, CHEN Hui¹, ZHU Qing-guo¹, WU Yan-an¹, WANG Yi¹, HUANG Hui-fang¹. ¹Department of Cardiology, Fujian Provincial Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, China

【Abstract】 Objective To analysis and identify mutations of the RET proto-oncogene in a family with MEN-II A syndrome. **Methods** The DNA was extracted from their peripheral blood. The exons10, 11 of RET proto-oncogene of the proband and her four family members were amplified by polymerase chain reaction (PCR), and the PCR products were sequenced. And then discuss its clinical significance in the choice strategy of surgical treatment. **Results** A missense mutation of TGC(Cys) to CGC(Arg) at codon 634 in exon 11 of the RET proto-oncogene was detected. **Conclusions** The molecular genetic analysis is helpful in the choice strategy of precautionary surgical treatment.

【Key words】 Multiple endocrine neoplasia; Pheochromocytoma; medullary thyroid carcinoma; Mutation

MEN II A 综合征属于单基因显性遗传难治性高血压的一种。多发性内分泌腺瘤病 II 型(multiple endocrine neoplasia type II, MEN II, Sipple syndrome),可分为三种亚型: MEN2A、MEN2B 及家族性甲状腺髓样癌(FMTC), MEN2A 综合征以嗜铬细胞瘤、甲状腺髓样癌(medullary thyroid carcinoma, MTC)和或合并甲状旁腺功能亢进症组成为特征。RET 原癌基因突变是 MEN II A 综合征这一疾病的分子遗传学基础。本研究对一 MEN II A 综合征患者家系的常见热点突变位点,如 RET 原癌基因第 10、11 外显子进行筛查检测,现报告如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象:先证者,福建莆田,女,33 岁,以“多汗、心悸 17 年,伴头痛 3 年”为主诉收入住院,患者 17 年前开始出现多汗及心悸症状,10 年前及 3 年前 2 次因“甲状腺肿瘤”在当地医院行手术治疗,病理报告为“甲状腺髓样癌”,3 年前开始出现持续性头胀痛,也未监测血压,入院前 1 个月,在当地医院查 CT 示双侧肾上腺肿瘤。入院体检:P 118 次/分, BP 159/109 mm Hg,颈部见手术疤痕。右肾区轻叩击痛。随后在我院行在全麻下行“双侧肾上腺嗜铬细胞瘤切除术”,术中见左肾上腺肿瘤,大小约 8 cm×7 cm×6 cm,肾上腺中央静脉怒张,未触及肿大淋巴结,右肾上腺多发肿瘤,呈结节状,大小约 3.5 cm×3.5 cm×3 cm。家族史:据患者所知家系情况见图 1,但不包括部分患病或未患病表兄弟姐妹(具体人员不详),患者均有甲状腺髓样癌史。

基金项目:福建省青年科技人才创新项目(2008F3025)

作者单位:350001 福建医科大学省立临床医学院(骆杰伟、陈慧、朱庆国、伍严安、黄慧芳);福建省立医院病理科(王仪)

通讯作者:骆杰伟,Email: docluo@126.com

1.2 方法

1.2.1 DNA 抽提:根据知情同意原则,对包括先证者在内的自愿的三位家系患病成员(Ⅱ6,Ⅲ1,Ⅲ2)及先证者的无临床表现的二个孩子,取静脉血 2ml,用基因公司的 QIAGEN DNA 全血抽提试剂盒抽提 DNA。

1.2.2 DNA 扩增及测序:用 eppendorf PCR 仪扩增。对先证者 RET 原癌基因的第 10、11 外显子进行 PCR 扩增,第 10 外显子引物序列参照文献^[1]上游引物:5'-cagaaaggcactgtgaccaa-3',下游引物:5'-gggacctcagatgtgctgtt-3',扩增产物长度 375bp,反应条件:设置 95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 30 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 40 s,共 38 个循环,最后 72℃ 延伸 8 min;第 11 外显子引物用网络 Primer3 Input 软件设计,上游引物:5'-agccatgaggcagacatac-3',下游引物:5'-caccggaagaggagtagctg-3',反应条件:设置 95℃ 预变性 5 min,95℃ 变性 30 s,62℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,共 38 个循环,最后 72℃ 延伸 5 min,该扩增产物长度 280bp。PCR 扩增产物纯化后,采用 ABI-PRISM 3770 DNA 全自动测序仪(Applied Biosystems)进行自动测序反应,样本经不同时段 PCR 产物测序 3 次,结果完全一致,随后对其它成员有突

变的外显子进行 PCR 及测序。

2 结果

2.1 先证者术后组织病理证实为双肾上腺嗜铬细胞瘤组织,免疫组化见神经元特异性烯醇化酶(neuronal specific. enolase, NSE)阳性、S-100 蛋白单克隆抗体阳性,突触素(Synaptophysin, SY) 阳性,见图 2。

2.2 结果发现:5 位家族成员第 11 外显子 634 密码子均存在 TGC→CGC 突变,编码的氨基酸由 Cys(半胱氨酸)变为 Arg(精氨酸),见图 3。第 10 外显子未见有突变位点。

3 讨论

MEN II 综合征为常染色体显性遗传,外显率高,最早于 1961 年由 Sipple 描述,又称为 Sipple 综合征。至上世纪末国外报道有近 500 个家系^[2]。据国外资料,患病率约为(2~20)/10 万人,据不完全统计国内自报道以来总例数不超过 100 例,且多为临床个案总结及家系调查,而 MEN II A 占 MEN II 的 75%。基因检测是诊断 MEN II A 金标准^[3]。早期检测有助于防止漏诊或延误病情,并可用于产前筛查。

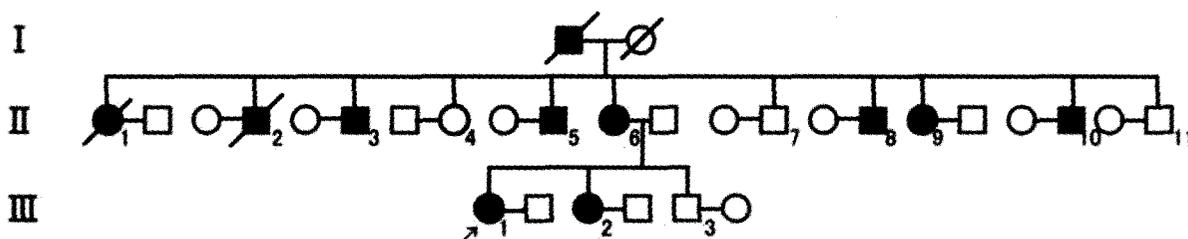


图 1 MEN-II A 患者家系图 □正常男性;○正常女性;□—○配偶关系;■●男性或女性患者;I、II、III代表世代数;1、2、3……每一世代各成员编号;↗:先证者。

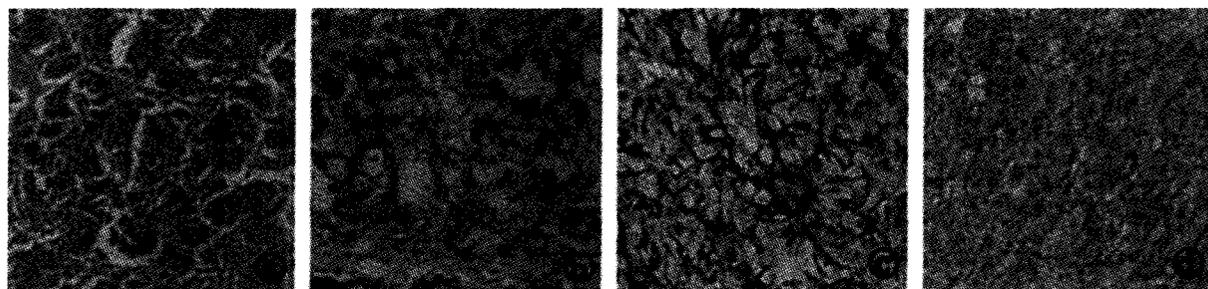


图 2 切除的肾上腺嗜铬细胞瘤组织 ○aHE 染色(双侧)肾上腺嗜铬细胞瘤,细胞生长活跃;免疫组化:○bNSE 阳性,○cS100 阳性,○dSY 阳性

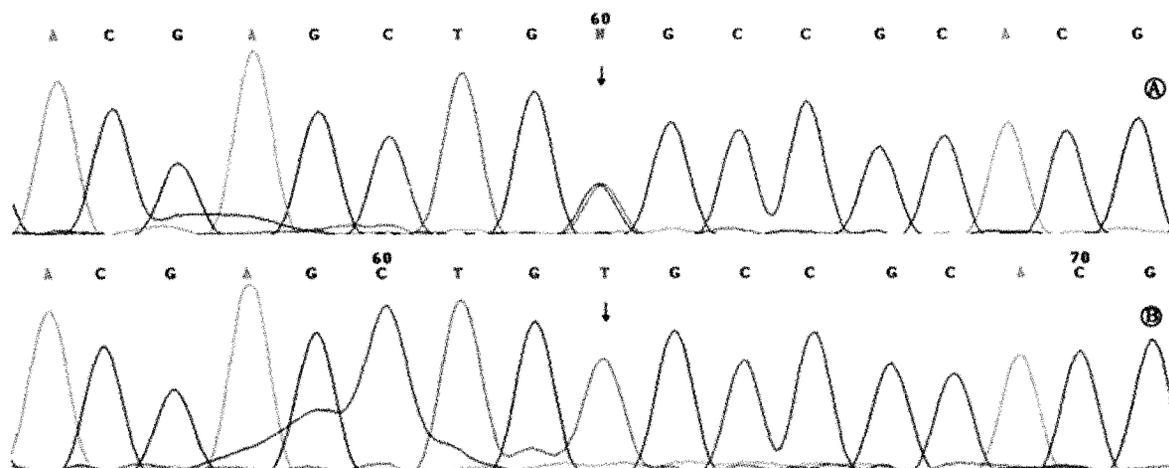


图3 RET原癌基因第11外显子测序图 ○A:RET原癌基因第11外显子634密码子存在TGC→CGC突变;○B:RET原癌基因野生型第11外显子634密码子TGC

RET原癌基因突变是MEN II A的主要分子遗传基础,98% MEN2A病例存在RET错义突变。基因定位于人10q11.2,编码一种属于酪氨酸激酶受体超家族的跨膜蛋白。已知的突变位点主要位于第11外显子634与第10外显子609、611、618、620这5个编码半胱氨酸(Cys)的密码子上^[4-5]。位于RET胞外区的这些突变使RET活性二聚体形成增加,其机制可能是被其他氨基酸取代的Cys无法形成分子内二硫键,而与邻近分子的Cys配对,使RET二聚体化,从而激发酪氨酸激酶自动磷酸化,进而活化MAPK途径,诱导细胞增生过度以至癌变。MEN II A患者约有87%为密码子634的突变,占52%类型是Cys634Arg(TGC→CGC),我们前后发现的二个家系均系此类型突变^[6];其次占25%为Cys634Tyr(TGC→TAC)。Mulligan等^[4]发现Cys634Arg与甲状旁腺的发病密切相关,同时患有MTC与甲状旁腺疾患的25个家族中,22个有C634R突变;仅患有MTC的12个家族中,则只有2个有这种突变。Karga等^[7]的研究也发现密码子634突变与甲状旁腺的病变密切相关,若患者出现嗜铬细胞瘤或甲状旁腺的病变,则几乎所有突变的位点均位于密码子634。上述表明密码子634的突变对肾上腺髓质与甲状旁腺细胞中RET基因功能表达影响较大。

Frank-Raue等主张对早期MEN II A基因携带者行预防性甲状腺切除术,治愈率可达100%^[8]。遗传型MTC家属中RET原癌基因突变者,以后90%以上要发展成MTC,通过检测RET基因突变,早期发现有MTC遗传倾向的人并对他们行预防性甲状腺切除术,这个观点已在学术界得到公认。

2001年欧洲MEN指南推荐MEN II应根据密码子突变方式进行危险分层选择外科治疗,危险水平1(中危转移的MTC):如携带609、768、790、791、804或891密码子突变(外显子10、13、14或15)的儿童,应行甲状腺切除术。危险水平2(高危转移的MTC),如携带611、618、620或634密码子突变的儿童(外显子10或11),应在6岁前行甲状腺全切加颈部淋巴结清扫术。手术年龄有三种选择:一种认为是5岁前手术,一种认为10岁为手术年龄,第三种是等待降钙素基础值或激发后异常作为手术指标。危险水平3(极高危转移的MTC):MEN2B患儿,如携带883、918或922密码子突变(外显子15或16),由于出生头1个月显微镜下的MTC就可发生转移,建议出生6个月前甚至1个月内行甲状腺全切加颈部淋巴结清扫术^[5]。多数患者一般先发生甲状腺髓样癌,治疗后应防治其复发,还应注意有无嗜铬细胞瘤的发生。对于MEN II患者的亲属应进行RET基因突变筛查,并定期检查B超及CT。早期的RET突变筛查为临床外科医师选择较佳的手术时机提供依据。

参 考 文 献

- 1 韩战营,张奎星,高平进,等. 一个IIa型多内分泌腺瘤病家系的RET原癌基因突变研究. 中华内分泌代谢杂志, 2002, 18(6): 428-431.
- 2 Eng C, Clayton D, Schuffenecker I, et al. The relationship between specific RET proto-oncogene mutations and disease phenotype in multiple endocrine neoplasia type 2. International RET mutation consortium analysis. JAMA, 1996, 276(19): 1575-1579.

- 3 Noll WW. Utility of RET mutation analysis in multiple endocrine neoplasia type 2. *Arch Pathol Lab Med*, 1999, 123(11):1047-1049.
- 4 Mulligan LM, Kwok JB, Healey CS, et al. Germ-line mutations of the RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2A. *Nature*, 1993, 363(6428):458-460.
- 5 Toledo SPA, Cortina MA, Toledo RA, et al. Impact of RET proto-oncogene analysis on the clinical management of multiple endocrine neoplasia type 2. *Clinics*, 2006, 61(1):59-70.
- 6 陈慧, 张祖杰, 骆杰伟. 多汗、头晕、心悸、伴颈部肿物(临床病例讨论). *中国医学论坛报*, 2007, 33(1): A06.
- 7 Karga HJ, Karayianni MK, Linos DA, et al. Germ line mutation analysis in families with multiple endocrine neoplasia type 2A or familial medullary thyroid carcinoma. *Eur J Endocrinol*, 1998, 139(4): 410-415.
- 8 Frank-Raue K, Hoppner W, Buhr H, et al. Results and follow-up in eleven MEN2a gene carriers after prophylactic thyroidectomy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 1997, 105(Suppl 4):76-78.