

胶质瘤中 Axin 基因点突变检测及表达研究

邵秋杰¹ 李青¹ 金利华² 赵一岭¹ 张英华³ 林圣彩² (¹第四军医大学西京医院病理科,陕西 西安 710032;²厦门大学生命科学学院,福建 厦门 361000;³武警 8610 部队医院内科,辽宁 盘锦 124010)

摘要 目的 检测胶质瘤中 Axin 基因的点突变及其表达情况,初步探讨 Axin 与胶质瘤发生的关系。方法 采用聚合酶链反应-单链构象多态性(PCR-SSCP)技术及 DNA 测序方法检测 Axin 基因外显子 8,9 及 10 在 28 例胶质瘤中的突变情况;同时对上述胶质瘤及正常脑组织进行免疫组化染色。结果 在 28 例胶质瘤组织中 Axin 的第 10 个外显子共有 6 例样本(21.4%) 3 处发生了错义突变;3 例 3 处发生了同义突变;28 例胶质瘤中 8 例(28.6%) Axin 表达阳性,正常脑组织中神经元表达阳性,神经胶质细胞表达阴性,检测到突变的样本中 1 例表达阳性。结论 Axin 基因的点突变可能参与胶质瘤的发生。

关键词 Axin; 神经胶质瘤; PCR; 免疫组织化学
中国图书资料分类号 R 739.41 文献标识码 A

Detection of point mutations of Axin gene and its expression in gliomas

SHAO Qiujie¹, LI Qing¹, JIN Lihua², ZHAO Yiling¹, ZHANG Yinghua³, LIN Shengcai²

¹Department of Pathology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032; ²School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361000; ³Department of Medicine, Armed Police 8610 Hospital, Panjin 124010, China

Abstract Objective To detect the point mutations of Axin gene and its expression in glioma and explore the relationship between Axin gene and the occurrence of human glioma. **Methods** The point mutations of exon 8,9,10 of Axin gene were analyzed in 28 cases of glioma by polymerase chain reaction single strand conformation polymorphism(PCR-SSCP) analysis, silver staining and DNA sequencing. Immunohistochemistry was used to detect the Axin expression in these cases and normal brain tissues. **Results** Three missense point mutations were detected in exon 10 of Axin gene in 6 cases(21.4%), in addition, 3 silent mutations were detected in 3 cases; Eight cases of glioma(28.6%) showed positive Axin expression, and in the normal brain tissues Axin was expressed in neurons but not in gliocytes. There was one sample expressed Axin among those with point mutations. **Conclusion** Point mutations of Axin gene may be involved in the occurrence of glioma in human.

Key words Axin; Glioma; PCR; Immunohistochemistry

Axin 是大鼠 *fused* 位点的基因编码产物,它的突变体显示出各种表型异常,包括胚胎体轴的复制,神经外胚层和心脏的异常等。1997 年 Li Zeng 等将 Axin 的 cDNA 克隆出来,报导了其基因结构^[1]。从此以后,学者们对 Axin 的研究也越来越深入。现已在多种恶性肿瘤中检测到 Axin 基因的突变,将野生型 Axin 基因转入肝脏及结肠直肠癌细胞中可诱导肿瘤细胞凋亡^[2],因而认为 Axin 对肿瘤的发生起抑制作用。胶质瘤是神经系统最常见肿瘤,约占颅内原发性肿瘤的 40%,本实验通过分子和蛋白水平的研究,初

步探讨 Axin 与胶质瘤的发生是否有关,以期对胶质瘤发生机理提供相关的理论依据。

材料与方法

一、材料

28 例胶质瘤样本为 2000 及 2001 年第四军医大学西京医院外科手术切除脑组织标本,5 例正常脑组织标本取自尸检标本,标本经 10% 福尔马林固定,石蜡包埋。其分级按照 WHO 标准:II 级 5 例,II~III 级 9 例,III 级 4 例,III~IV 级 2 例,IV 级 8 例。5 份正常人血作为检测突变时的正常对照。兔抗 Axin 多克隆抗体购于 Santa Cruz Biotechnology 公司,生物素化羊抗兔 IgG 购于武汉博士德公司。

基金项目:高等学校骨干教师计划资助项目;归国留学人员科研启动基金资助项目(1999747)

作者简介:邵秋杰,硕士研究生,电话:(029)3374541-119,E-mail: autumn018@163.com

二、方法

1. 聚合酶链反应-单链构象多态性 (polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism, PCR-SSCP) 方法检测点突变: 基因组 DNA 的提取: 将石蜡组织切成 10 μ 薄片 10 片, 装入 1.5 ml 的离心管, 二甲苯溶石蜡, 采用蛋白酶 K 消化, 常规酚/氯仿抽提法从肿瘤和血标本中提取基因组 DNA; 聚合酶链反应 (PCR) 条件及扩增程序: 设计四对引物^[2], 上游引物分别是 5' cctttgacgcgggtgttcc3', 5' cca ccgctgcctctcttcc3', 5' cctaccgcacctggtgag3', 5' cctcctca cctccgtcctg3'; 下游对应引物分别是 5' gggaggaccctcag gacg3', 5' tggactggcccagggtgac3', 5' ggggcaccccagccctc3', 5' cg-gccagcccaccagcct3'。PCR 反应总体积 25 μ l, 其中模板大约 350 ng, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM 三磷酸脱氧核糖核苷 (deoxyribonucleoside triphosphate, dNTP), 引物各 5 pM, Taq plus DNA 聚合酶 1U。反应程序: 94 预变性 5 min; 35 个循环 (94 变性 30 s, 50 ~ 60 退火 30 s, 72 延伸 1 min), 72 延伸 10 min。产物在 2.0% 琼脂糖凝胶中电泳鉴定, 纯化目的 DNA 片段; SSCP 分析及银染: 5 μ l PCR 产物与二倍体积的变性上样缓冲液 [甲酰胺 95% 20 mM, 1 mM 乙二胺四乙酸 (pH 8.0), 溴酚兰 0.05%, 二甲苯青 0.05%] 混合, 95 变性 10 min, 立即冰浴, 加样于 10% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶 (39 μ l) 中, 室温下电泳, 120 V 3 ~ 5 h, 银染^[3]; 差异带回收及再次扩增: 切下差异带置于 1.5 ml Eppendorf 管中, 用 DNA 胶回收试剂盒回收, 纯化其中的 DNA, 取 2 μ l 做模板, 用相同的条件再次扩增。扩增产物在 2.0% 琼脂糖凝胶上

鉴定后纯化, 用于基因克隆; 克隆 PCR 产物, 煮沸法小量提取质粒, Bam HI, Xho I 双酶切鉴定, DNA 测序由上海 Sangon 公司完成; 测序结果均在 Genbank 数据库中进行比较分析。

2. 免疫组化: 组织切片经微波处理后, 采用链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物 (strept-avidin-biotin complex, SABC) 法, 正常兔血清及磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered solution, PBS) 代替一抗作阴性对照。

结 果

一、点突变检测结果

从石蜡组织及血液中所提基因组 DNA 经 PCR 扩增均得到了预期长度的 DNA 片段, 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳时第 10 外显子出现了明显的差异带, 差异带中 DNA 的测序结果在 Genbank 数据库中 (登录号分别为 AE006463 及 AE006463-4) 比较得到相应的 DNA 及氨基酸的变化, 如表 1 所示: 例如在 Axin 的 DNA 第 20801 处有 3 例样本的鸟嘌呤 G 突变成腺嘌呤 A, mRNA 上密码子由 GUG 变成 AUG, 相应的第 836 个氨基酸则由原来的缬氨酸 V 变成了蛋氨酸 M。28 例胶质瘤中共有 6 例 3 处发生错义突变, 3 例 3 处发生同义突变。其中 II 级 1 例, III 级 3 例, IV 级 2 例, 错义突变率为 21.4%。上述结果均在另一次 PCR-SSCP 分析中重复出现 (图 1 显示表 1 中突变样本的 SSCP 图, 箭头所指为差异带。C 为正常对照, T 为肿瘤组织)。

表 1 28 例胶质瘤中 Axin 基因外显子 10 的点突变检测结果

Tab 1 Sequence alterations in exon 10 of Axin in 28 cases of glioma

Position in DNA (Genbank AE006463)	Code change	Amino acid change (Genbank AE006463-4)	Sum of mutant samples
20801 g-a	GUG-AUG	V836M	3
20785 g-a	CGA-CAA	R841Q	2
20723 g-a	GAC-AAC	D862N	1
20831 a-g	AAA-AAG	826K	1
20736 a-g	AAA-AAG	857K	1
20733 g-a	GUG-GUU	858V	1

讨 论

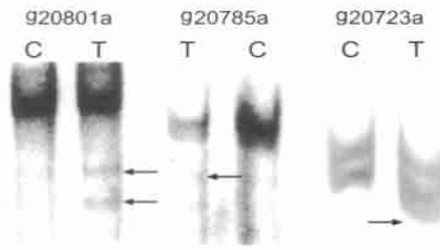


图1 示突变样本的SSCP图

Fig 1 As fig1 to fig3 showing , aberrantly migrating bands are pointed by the arrows on the results of SSCP analysis , and sequence results confirms the base alterations which are g20801a, g20785a and g20723a respectively. (T for tumor samples and C for the control)

二、免疫组化结果

正常脑组织中神经元胞浆表达阳性,神经胶质细胞表达阴性;8例(28.6%)胶质瘤组织中瘤细胞Axin胞浆表达阳性,其中II级1例,II~III级2例,III级2例,IV级3例,检测到突变的样本中有1例Axin表达阳性。(图2,3)

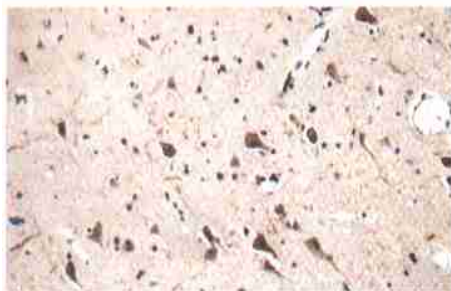


图2 正常脑组织中,Axin在神经元表达阳性而神经胶质细胞表达阴性(SABC, x400)

Fig 2 In normal brain tissue , Axin expressed in neuron but not in glia-cyte by immunohistochemistry(SABC, x400)

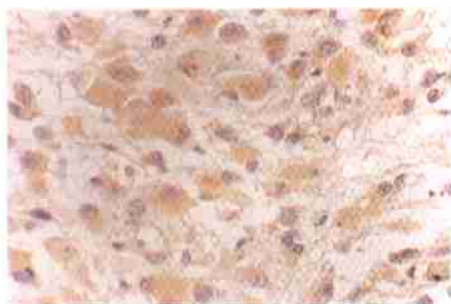


图3 Axin在胶质瘤中肿瘤细胞胞浆表达阳性(SABC, x400)

Fig 3 Axin expressed in cytoplasm of tumor cells in glioma by immunohistochemistry(SABC, x400)

Axin作为一种支架蛋白,有许多功能结构域,能同多种蛋白质结合,包括腺瘤性息肉蛋白(adonomatous poliposos coli ,APC)、Dvl (dishevelled)、糖原合成激酶-3 (glycogen synthase kinase-3 ,GSK-3)、-连环素(-catenin)等蛋白,作用于Wnt信号和Jun N端激酶/应激活化的蛋白激酶(Jun N-terminal kinase/ stress-activated protein kinase ,JNK/ SAPK)信号两条通路^[5~7]。Wnt信号通路是对生长发育起重要作用的通路,该通路异常与一些肿瘤发生密切相关。在没有Wnt信号时,Axin与APC、Dvl、-catenin、GSK-3及自身形成多蛋白复合体,GSK-3磷酸化-catenin,使其降解,下调其水平。在Wnt信号存在时,GSK-3失去磷酸化-catenin的能力,使-catenin在胞浆内积聚,转入核内与淋巴增强因子(lymphoid enhancer factor ,LEF)、T细胞因子(T-cell factor, TCF)相互作用,导致细胞周期蛋白D(cyclinD)等过度表达,从而导致肿瘤发生^[4,5]。在JNK/SAPK信号转导通路中,对Axin的研究很少,已知Axin与通路中MEK激酶1相互作用,并形成寡/二聚体参与该通路的激活,从而调控细胞分化、凋亡等^[6,7]。在肝癌、结直肠癌、乳腺癌、髓母细胞瘤中检测到Axin基因突变^[2,7,8],而在儿童肾脏肿瘤中并未检测其突变^[9]。

本实验中检测到的突变点均位于Axin的C末端第10个外显子上,Dvl结构域位于此区域,C末端还是Axin与自身结合形成寡聚体的部位,寡聚体的形成是Axin执行正常功能的结构基础^[10]。外显子10的DNA碱基序列发生了变化,mRNA及氨基酸序列随之发生相应改变:V836M,缬氨酸变成蛋氨酸,由非极性氨基酸变成了极性氨基酸;D862N,天门冬氨酸变成了天门冬酰胺,氨基酸的等电点发生了变化,由酸性氨基酸变成了中性氨基酸;R841Q,精氨酸变成谷氨酰胺,由碱性氨基酸变成了中性氨基酸,这些变化意味着Axin蛋白空间构象和功能上可能会发生一些变化,从而使信号传导通路异常。Wnt信号通路中可能导致GSK-3不再磷酸化-catenin,使-catenin在胞浆内积聚,最后引起肿瘤发生,因此Axin基因的突变可能参与了胶质瘤的发生。

免疫组化显示有近30%的胶质瘤中瘤细胞胞浆有阳性反应,正常脑组织中神经胶质细胞没有表达,但未呈现明显的随着胶质瘤恶性程度增加而表达增加的趋势。在发生突变的样本只有一例Axin表达阳性,并不是所有突变的样本都表达。这是个有趣的结

果,一方面它显示了肿瘤和正常组织中 Axin 表达确有不同,但另一方面也提出问题:分子蛋白水平的变化并不一致,是因为突变并未影响蛋白结构,还是该基因的其它外显子在胶质瘤中有变化,或是其它原因? Axin 在正常脑组织中神经元中起什么作用? 已发现的这些突变如何以及在多大程度上改变了蛋白质的功能? 相信随着研究的深入,更多问题的解决将为阐明胶质瘤的发生提供有力的理论依据。

参 考 文 献

- Zeng L, Fagotto F, Zhang T, et al. The mouse Fused locus encodes Axin, an inhibitor of the Wnt signaling pathway that regulates embryonic axis formation [J]. Cell, 1997, 90(1): 181 - 192.
- Satoh S, Daigo Y, Furukawa Y, et al. AXIN1 mutations in hepatocellular carcinomas, and growth suppression in cancer cells by virus mediated transfer of AXIN1 [J]. Nat Genet, 2000, 24(3): 245 - 250.
- Budowle B, Chakraborty R, Gusti AM, et al. Analysis of the VNTR locus DIS80 by the PCR followed by high-resolution PAGE [J]. Am J Hum Genet, 1991, 48(1): 137 - 144.
- Jho E, Lomvardas S, Costantini F. A GSK3beta phosphorylation site in axin modulates interaction with beta-catenin and Tcf-mediated gene expression [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 266(1): 28 - 35.
- Fagotto F, Jho E, Zeng L, et al. Domains of axin involved in protein-protein interactions, Wnt pathway inhibition, and intracellular localization [J]. J Cell Biol, 1999, 145(4): 741 - 756.
- Zhang Y, Qiu WJ, Liu DX, et al. Differential molecular assemblies underlie the dual function of Axin in modulating the WNT and JNK pathways [J]. J Biol Chem, 2001, 276(34): 32152 - 32159.
- Webster MT, Rozycka M, Sara E, et al. Sequence variants of the axin gene in breast, colon, and other cancers: an analysis of mutations that interfere with GSK3 binding [J]. Genes Chromosomes Cancer, 2000, 28(4): 443 - 453.
- Dahmen RP, Koch A, Denkhaus D, et al. Deletions of AXIN1, a component of the WNT/wingless pathway, in sporadic medulloblastomas [J]. Cancer Res, 2001, 61(19): 7039 - 7043.
- Miao J, Kusafuka T, Udatsu Y, et al. Axin, the main component of the Wnt signaling pathway, is not mutated in kidney tumors in children [J]. Int J Mol Med, 2002, 9(4): 377 - 379.
- Sakanaka C, Williams LT. Functional domains of axin. Importance of the C terminus as an oligomerization domain [J]. J Biol Chem, 1999, 274(20): 14090 - 14093.

(收稿日期:2003 - 05 - 05;修稿日期:2003 - 07 - 27)

2003 年度诺贝尔化学奖获得者简介

瑞典皇家科学院今年 10 月 8 日宣布,将 2003 年诺贝尔化学奖授予美国科学家彼得·阿格雷和罗德里克·麦金农,以表彰他们在细胞膜通道方面做出的开创性贡献。阿格雷得奖是由于发现了细胞膜水通道,而麦金农的贡献主要是在细胞膜离子通道的结构和机理研究方面。他们的发现阐明了盐分水如何进出组成活体的细胞。

阿格雷只有 54 岁,而麦金农才 47 岁。他们的成果新:麦金农的发现产生于 5 年前;阿格雷的工作于 1998 年完成。诺贝尔科学奖通常颁发给年龄较大的科学家,获奖成果都经过几十年的检验。据瑞典媒体评论,阿格雷和麦金农的获奖在诺贝尔科学奖历史上是较罕见的。今年诺贝尔化学奖及医学奖的结果都显示出了当代科学跨领域研究的趋势。

早在 100 多年前,人们就猜测细胞中存在特殊的输送水分子的通道。但直到 1988 年,阿格雷才成功地分离出了一种膜蛋白质,之后他意识到它就是科学家孜孜以求的水通道。评选委员会说,这是一重大发现,开启了细菌、植物和哺乳动物水通道的生物化学、生理学和遗传学研究之门。

离子通道是另一种类型的细胞膜通道,神经系统和肌肉等方面的疾病与之有关,它还能产生电信号,在神经系统中传递信息。但由于科学家一直不能弄清楚它的结构,故进一步的研究无法展开。而麦金农在 1998 年测出了钾通道的立体结构,震惊了所有的研究团体。评选委员会认为,由于他的发现,人们可以“看见”离子如何通过由不同细胞信号控制开关的通道。

阿格雷 1949 年生于美国明尼苏达州小城诺斯菲尔德,1974 年在巴尔的摩约翰斯·霍普金斯大学医学院获医学博士学位,现为该学院生物化学和医学教授。麦金农 1956 年出生,在美国波士顿附近的小镇伯灵顿长大,1982 年在塔夫茨医学院获医学博士学位,现为洛克菲勒大学分子神经生物学和生物物理学教授。