

一例双侧肾透明细胞癌患者与家系成员 VHL 基因的胚系突变分析

施爱军¹, 吴剑秋², 尹娜², 吴晓柳², 康铮²

(1. 南通市如东县中医院检验科, 江苏如东 226400; 2. 江苏省肿瘤医院 & 江苏省肿瘤防治研究所 & 南京医科大学附属肿瘤医院, 南京 210009)

摘要:目的 对一例家族性双侧肾透明细胞癌患者家系 VHL 基因的胚系突变进行分析, 结合其临床特点探讨可能的分子遗传学发病机制。方法 收集病人家族史、影像学、入院诊疗和随访资料, 提取患者及家系直系成员外周血 DNA 和 RNA, 采用 PCR-DNA 测序、荧光定量 PCR, RT-PCR 片段长度和序列分析等方法进行 VHL 基因病理性胚系突变位点的筛查和验证。结果 PCR-DNA 测序分析结果显示在这家系成员中均没有发现 VHL 基因编码区的点突变; VHL 基因外显子拷贝数的定量分析数据显示 VHL 基因外显子 2 拷贝数减少; RT-PCR 产物电泳和测序结果表明先证者与其兄二人存在 VHL 基因第 2 外显子杂合性缺失所致的病理性胚系突变。结论 家族性肾细胞癌家系中 VHL 基因的胚系突变筛查可作为一种有效的手段预测患者的预后, 并可指导临床。

关键词: 家族性肾细胞癌; VHL 基因; 胚系突变

中图分类号: R737.11; R730.43 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414 (2021) 02-035-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2021.02.009

Germline Mutation Analysis of VHL Gene in a Case of Bilateral Clear Cell Renal Cell Carcinoma and Family Members

SHI Ai-jun¹, WU Jian-qiu², YIN Na², WU Xiao-liu², KANG Zhen²

(1. Department of Laboratory Medicine, Rudong County Hospital of Traditional Chinese Medicine, Jiangsu Rudong 226400, China; 2. Jiangsu Cancer Hospital & Jiangsu Institute of Cancer Research & the Affiliated Cancer Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: Objective This article analyzes the germline mutation of VHL gene in a family of a patient with familial bilateral clear cell renal cell carcinoma, and discusses the possible molecular genetic pathogenesis based on its clinical characteristics. **Methods** Collected the patient's family history, imaging, hospital admission and follow-up data, extract the peripheral blood DNA and RNA of the patient and family members, and use PCR-DNA sequencing, fluorescent quantitative PCR, RT-PCR fragment length and sequence analysis to analyze the VHL gene Screening and verification of pathological germline mutation sites. **Results** PCR-DNA sequencing analysis results showed that no point mutation in the coding region of the VHL gene was found in the members of this family. The quantitative analysis data of the VHL gene exon copy number showed that the VHL gene exon 2 copy number was reduced. RT-PCR product the results of electrophoresis and sequencing showed that the proband and his brother had pathological germline mutations caused by the loss of heterozygosity in the second exon of the VHL gene. **Conclusion** The germline mutation screening of VHL gene in familial renal cell carcinoma families can be used as an effective method to predict the prognosis of patients and guide clinical practice.

Keywords: familial renal cell carcinoma; VHL gene; germline mutation

肾透明细胞癌是肾细胞癌的主要病理类型, 约占肾细胞癌的 80%, 也是家族性肾细胞癌的主要病理类型^[1-2]。肾细胞癌的发生涉及到了很多基因, 其中, VHL (von Hippel-Lindau, VHL) 基因的研究是近年来学者们研究的一个热点。VHL 基因是一个典型的抑癌基因, 其编码蛋白产物 pVHL 是泛

素连接酶的组成成分之一, 后者在细胞的增殖、凋亡和癌细胞的浸润、转移中起到了巨大的作用^[3]。在肾细胞癌组织中普遍存在着 VHL 基因的体系突变, 常见的突变形式包括点突变、杂合性缺失 (loss of heterozygosity, LOH) 及甲基化^[4]; VHL 基因的胚系突变则常发生于家族性、遗传性肾细胞癌和肿

基金项目: 江苏省卫生健康委基金 (H2019100); 江苏省卫生健康委保健局基金 (BJ190323)。

作者简介: 施爱军 (1977-), 女, 本科, 学士学位, 副主任技师, 研究方向: 微生物免疫学, E-mail: 645334735@qq.com。

通讯作者: 康铮, E-mail: 1325833475@qq.com。

瘤易感综合征家系中^[5]。本文对一例家族性双侧透明肾细胞癌患者家系的 VHL 基因的胚系突变进行分析,结合其临床特点探讨可能的分子遗传学发病机制。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 患者家系调查:经患者及其家族成员的同意,我们调查了其家系(见图1)。患者Ⅲ2(30岁)与其兄Ⅲ1(34岁)皆患有肾肿瘤,其父Ⅱ2因肝硬化于42岁死亡。

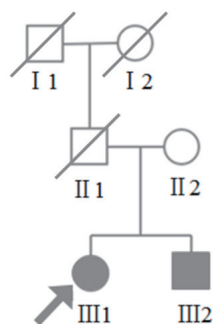


图1 患者家系图(箭头所指为先证者)

1.1.2 患者临床资料:患者,女,30岁,因双肾占位入我院。患者BMI达46.9,属重度肥胖,并发脂肪肝。其兄亦有重度肥胖及单侧肾肿瘤史。CT检查发现患者双肾占位,两侧附件区出现囊肿。行左肾部分切除术,好转出院。术后病理诊断为左肾透明细胞癌Ⅰ~Ⅱ级。左肾术后三个月再次入院进行右肾根治性切除术,术后病理显示右肾透明细胞癌Ⅲ级,伴大面积坏死。右肾术后三个月第一次随访CT检查,新见多发肺转移,术后9个月第二次随访CT检查,发现双侧肺、双侧肾上腺出现多发性转移同时伴有髂骨、右侧股骨头、L3椎体骨转移。

1.2 仪器与试剂 淋巴细胞分离液(lympholyte-H, Cedarlane公司),外周血白细胞基因组DNA和RNA提取试剂盒(QIAamp DNA/RNA Blood Midi Kit, QIAGEN公司),逆转录试剂盒(Vazyme HiScript® II Reverse Transcriptase, Vazyme Biotech公司),PCR试剂盒(TaKaRa LA Taq® with GC Buffer, TaKaRa公司)。

1.3 方法

1.3.1 外周血白细胞基因组DNA和RNA提取:收集先证者、其家系成员以及正常对照者外周血标本,分离白细胞,采用QIAamp DNA/RNA Blood Midi Kit,按照试剂盒说明书步骤分别提取VHL综合征家系成员及正常对照者的外周血白细胞基因组DNA和RNA。

1.3.2 PCR-DNA测序检测VHL基因碱基突变、微小插入和缺失:PCR扩增VHL基因三个外显子,引物序列参考文献[6]。PCR反应体系:25μl,内含50~100ng基因组DNA,0.2mmol/L dNTP,上下游引物各0.5μmol/L, Taq HS DNA聚合酶2U。PCR条件:94℃预变性5min,94℃20s,58~62℃40s,72℃20s,35个循环,72℃延伸7min。2g/dl琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,对PCR产物进行DNA片断纯化回收,送交公司测序后进行序列分析。

1.3.3 荧光实时定量PCR检测VHL基因外显子拷贝数变异:使用TaKaRa SYBR Premix EX Taq™试剂盒进行实时定量PCR检测,引物序列参考文献[5]。PCR反应体系和条件参考文献[7],50μl体系:含引物200nmol/L,基因组20ng,SYBR Premix EX Taq™5μl;PCR反应条件:95℃1min,94℃5s/60℃20s,45个循环,每个样品做3个平行管,每次实验至少重复3次。

进行数据分析采用 $\Delta\Delta Ct$ 法。 Ct 是指达到荧光检出界限阈值时的循环数。计算公式: $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{实验组目的基因}} - Ct_{\text{实验组内参基因}}) - (Ct_{\text{对照组目的基因}} - Ct_{\text{对照组内参基因}})$ 。相对拷贝数 $(\text{实验组}/\text{对照组}) = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。设定正常人的值为1,患者 $2^{-\Delta\Delta Ct} > 1.25$ 时,判断基因拷贝数增加,而 < 0.75 时判断基因拷贝数减少。

1.3.4 RT-PCR扩增测序验证外显子单拷贝缺失:使用Vazyme HiScript® II Reverse Transcriptase试剂盒对患者及其家系的RNA样本进行反转录,以反转录所得cDNA作为模板进行PCR,分别在exon1和exon3区域设计上下游引物,上游引物序列CTGCCCCGTATGGCTCAACTTC,下游引物序列CTGACCTGTAGCAGTCCAGCG,扩增长度为298bp。使用TaKaRa LA Taq® with GC Buffer试剂盒进行扩增反应,RT-PCR反应体系和条件参考文献[8],50μl反应体系包括上下游引物各500nmol/L, TaKaRa La Taq 0.5μl, cDNA40ng, dNTP Mixture 8μl, Buffer II 25μl;反应条件:94℃预变性5min,94℃20s,62℃30s,72℃20s,35个循环,72℃延伸7min。1.5g/dl琼脂糖凝胶电泳检测RT-PCR产物长度。对RT-PCR产物进行DNA片断的纯化回收、测序(南京思普金生物科技有限公司)。

2 结果

2.1 PCR-DNA测序分析结果 运用PCR-DNA测序技术检测VHL基因的点突变,检测家系中先证者和其他患者的VHL基因编码区是否存在点突变。发现在该家系成员中均没有发现VHL基因编码区的点突变。

2.2 VHL基因外显子拷贝数的定量分析结果 采

用 $\Delta\Delta Ct$ 法进行数据分析, 相比于正常对照该患者与其兄 VHL 基因外显子 2 相对拷贝数在 0.62 左右, 小于 0.75。

2.3 RT-PCR 产物电泳和测序结果 见图 2。以逆转录所得 cDNA 作为模板进行 RT-PCR 扩增, 正常人产物片段长度应为 298bp, 已知 VHL 基因 exon2 长度为 123bp, 图 2 中所示患者的 cDNA 产物琼脂糖凝胶电泳出现两条区带, 且两条带间距符合 VHL 基因 exon2 杂合性缺失。将 RT-PCR 产物直接测序显示由于 exon2 的杂合性缺失, 测序图在异常剪接起始位点处开始同时出现 exon2 和 exon3 序列信号。序列解读的结果显示缺失片段为 123bp 的 exon2, 见图 3。

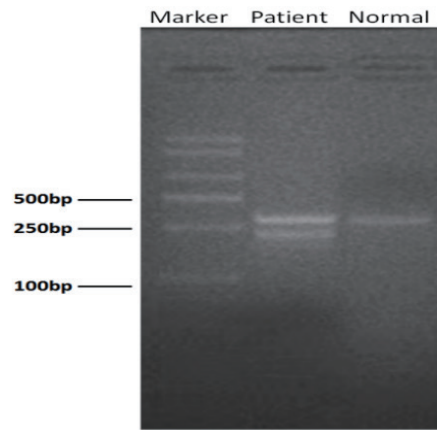


图 2 RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

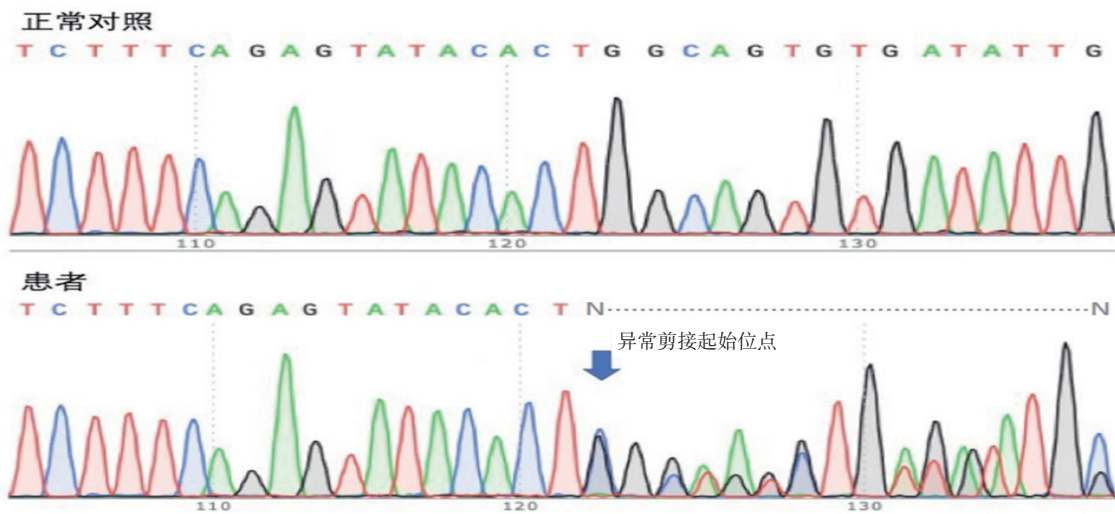


图 3 外显子 2 杂合性缺失的 cDNA 测序图

3 讨论

VHL 为抑癌基因, 定位于 3p25-26, 全长 45kb, 含有 3 个外显子, 所编码的蛋白含有 213 个氨基酸 (pVHL213)。pVHL213 可以与缺氧诱导因子 (hypoxia-inducible factor, HIF) 的 α 亚基结合, 使 HIF 泛素化后导致其降解, 从而抑制 HIF 的下游产物如血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、转化生长因子 (transforming growth factor- α , TGF- α) 等分子的表达^[9]。当 pVHL213 不能正常合成时可引起 HIF 的积累, 从而激活下游信号通路导致多种肿瘤的发生。

本文所研究的患者为双侧肾透明细胞癌, 病程发展较快, 随访发现多部位的转移灶, 同时多处出现骨转移。相对于散发型肾细胞癌, 家族型 VHL 相关肾癌起病较早, 且易产生新病灶和多发性转移, 预后较差^[9]。患者与其兄肾癌发病年龄均低于 35 岁, 符合家族性肾癌早发的临床特点, 另外患者双侧、多灶性肾肿瘤, 皆提示了其基因变异的可能性。本研究对患者外周血 VHL 基因三个外显子进行扩增

后测序表明这个家系中不存在点突变、采用实时定量 PCR 技术检测 3 个外显子的拷贝数变化, 发现患者与其兄外显子 2 的拷贝数明显低于正常对照且外显子 2 处出现套峰, 缺失片段为 123bp。研究结果表明该患者 VHL 基因存在第 2 外显子单拷贝缺失的病理性胚系突变, 该突变基因编码的蛋白仅仅含有 172 个氨基酸 (pVHL172)。

已有文献表明 pVHL172 可以上调促癌基因的表达^[10], 正常的 pVHL213 能够通过上调纤维连蛋白和胶原蛋白的表达而降低肿瘤细胞的侵袭转移能力^[11-12], 而 pVHL172 则可以通过 TGF- β 信号通路上调基质金属蛋白酶 13 (matrix metalloproteinase, MMP13), 促进肿瘤细胞的侵袭转移^[13]。该机制可能是导致该先证者发生多器官转移的原因之一。

本研究中该家系患者与其患病兄长均属于重度肥胖, 患者亦被诊断为脂肪肝, 其父 42 岁死于脂肪肝导致的肝硬化。此或与其家系 VHL 基因的突变导致 pVHL213 不能正常合成, 体内 HIF 的分解减少, 引起下游 HIF 的积累有关。已有研

究显示 HIF 可通过促进磷酸脱氢酶 (phosphate dehydrogenase, PDH) 的失活, 抑制丙酮酸进入三羧酸循环 (tricarboxylic acid cycle, TCA), 进而影响正常脂质代谢^[14]。VIRTUE 等^[15] 人的动物实验亦发现 HIF 复合物的积累可促进实验动物肥胖、脂肪肝和 2 型糖尿病的发生发展。

综上所述, 家族性肾细胞癌家系中 VHL 基因的胚系突变筛查可作为一种有效的手段预测患者的预后, 并可用于临床的诊断。

参考文献:

- [1] HIRSCH M S, SIGNORETTI S, DAL CIN P, et al. Adult renal cell carcinoma: a review of established entities from morphology to molecular genetics[J]. Surg Pathol Clin, 2015, 8(4): 587-621.
- [2] 和新盈, 王书文, 李宇, 等. miR-25 靶向作用 FBXO33 在肾透明细胞癌凋亡及预后的相关实验研究[J]. 现代检验医学杂志, 2017, 32(1): 38-40, 44.
HE Xinying, WANG Shuwen, LI Yu, et al. Study on the relationship of miR-25 targeting FBXO33 with cell apoptosis and prognosis in renal cell carcinoma[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2017, 32(1): 38-40, 44.
- [3] LATIF F, TORY K, GNARRA J, et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene[J]. Science, 1993, 260(5112): 1317-1320.
- [4] The Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma[J]. Nature, 2013, 499(7456): 43-49.
- [5] GERLINGER M, HORSWELL S, LARKIN J, et al. Genomic architecture and evolution of clear cell renal cell carcinomas defined by multiregion sequencing[J]. Nat Genet, 2014, 46(3): 225-233.
- [6] 赵琳, 阿勒滕·齐格格, 蒋晶晶, 等. 两个 von Hippel-Lindau 综合征家系的临床和分子生物学研究[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2014, 30(12): 1104-1107.
ZHAO Lin, ALETENG·Qiqige, JIANG Jingjing, et al. Clinical and genetic analysis of the von Hippel-Lindau (VHL) gene in two Chinese pedigrees with VHL syndrome [J]. Chinese Journal of Endocrinology and Metabolism, 2014, 30(12): 1104-1107.
- [7] 马丽颜, 梁静, 周建龙, 等. 腺瘤样结肠息肉易感基因 (APC) 及结直肠癌缺失基因 (DCC) 基因甲基化在肺癌早期诊断的意义[J]. 现代检验医学杂志, 2016, 31(1): 17-20.
- [8] MA Liyan, LIANG Jing, ZHOU Jianlong. Evaluation of the combination of APC and DCC gene methylation in the early diagnosis of lung cancer[J]. Journal of Modern Laboratory Medicine, 2016, 31(1): 17-20.
- [9] CHINTALA S, NAJRANA T, TOTH K, et al. Prolyl hydroxylase 2 dependent and Von-Hippel-Lindau independent degradation of Hypoxia-inducible factor 1 and 2 alpha by selenium in clear cell renal cell carcinoma leads to tumor growth inhibition[J]. BMC Cancer, 2012, 12: 293.
- [10] BYLER TK, BRATSLAVSKY G. Hereditary renal cell carcinoma: genetics, clinical features, and surgical considerations[J]. World J Urol, 2014, 32(3): 623-630.
- [11] HASCOET P, CHESNEL F, JOUAN F, et al. The pVHL172 isoform is not a tumor suppressor and up-regulates a subset of pro-tumorigenic genes including TGFB1 and MMP13[J]. Oncotarget, 2017, 8(44): 75989-76002.
- [12] KURBAN G, DUPLAN E, RAMLAL N, et al. Collagen matrix assembly is driven by the interaction of von Hippel-Lindau tumor suppressor protein with hydroxylated collagen IV alpha 2[J]. Oncogene, 2008, 27(7): 1004-1012.
- [13] CHESNEL F, HASCOET P, GAGNE J P, et al. The von Hippel-Lindau tumour suppressor gene: uncovering the expression of the pVHL172 isoform[J]. Br J Cancer, 2015, 113(2): 336-344.
- [14] JUN J C, DEVERA R, UNNIKRISHNAN D, et al. Adipose HIF-1alpha causes obesity by suppressing brown adipose tissue thermogenesis[J]. J Mol Med (Berl), 2017, 95(3): 287-297.
- [15] VIRTUE S, VIDAL-PUIG A. Nothing iffy about HIF in the hypothalamus[J]. PLoS Biol, 2011, 9(7): e1001116.

收稿日期: 2020-09-21

修回日期: 2020-10-24

(上接第34页)

- [7] CHATTERJEE B, DENG Yun, HOLLER A, et al. CD8⁺ T cells retain protective functions despite sustained inhibitory receptor expression during Epstein-Barr virus infection in vivo[J]. PLoS Pathogens, 2019, 15(5): e1007748.
- [8] WOLF Y, ANDERSON A C, KUCHROO V K. TIM3 comes of age as an inhibitory receptor[J]. Nature Reviews Immunology, 2020, 20(3): 173-185.
- [9] PAUKEN K E, GODEC J, ODORIZZI P M, et al. The PD-1 pathway regulates development and function of memory CD8(+) T cells following respiratory viral infection[J]. Cell Reports, 2020, 31(13): 107827.

收稿日期: 2020-11-14

修回日期: 2020-11-25