

## RET 基因 Cys 634 Trp 突变致多发性内分泌腺瘤 2A 型

宁志伟<sup>\*#</sup>, 王 鸥, 裴 育, 孟迅吾, 邢小平, 夏维波, 李 梅, 周学瀛, 曾正陪

(中国医学科学院 中国协和医科大学 北京协和医院内分泌科, 北京 100730)

**摘要:** **目的** 明确一个多发性内分泌腺瘤 2A 型 (MEN2A) 家系致病基因 *RET* 的基因型。**方法** 应用 PCR 技术对 *RET* 基因的第 10、11、13、14、15 和 16 外显子进行扩增, 将扩增产物纯化后双向测序。**结果** 先证者及其弟弟 *RET* 基因第 10、13、14、15 和 16 外显子均无异常, 第 11 外显子的第 14 996 位核苷酸存在 C-G 替代, 其反义链测序为 14 996 G-C 替代, 这种替代 (TGC-TGG) 使编码的氨基酸由半胱氨酸突变为色氨酸 (Cys 634 Trp, C 634 W)。正常对照 *RET* 基因的第 10、11、13、14、15 和 16 外显子区域均未见异常。**结论** 该 MEN2A 家系的遗传基础是 *RET* 基因 Cys 634 Trp 突变。

**关键词:** 多发性内分泌腺瘤 2 型; 甲状旁腺功能亢进; 甲状腺髓样癌; 嗜铬细胞瘤; *RET*; 基因突变; 基因诊断

**中图分类号:** R394.3; R58 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-503X(2006)06-0799-04

## RET Gene Cys 634 Trp Mutation in a Multiple Endocrine Neoplasia Type 2A Kindred

NING Zhi-wei<sup>\*#</sup>, WANG Ou, PEI Yu, MENG Xun-wu, XING Xiao-ping,  
XIA Wei-bo, LI Mei, ZHOU Xue-ying, ZENG Zheng-pei

(Department of Endocrinology, PUMC Hospital, CAMS and PUMC, Beijing 100730, China)

**ABSTRACT: Objective** To identify the genotype of *RET* gene in one multiple endocrine neoplasia type 2A (MEN2A) kindred. **Methods** Genome DNA was extracted from peripheral blood leucocytes. The DNA sequence of gel-purified polymerase chain reaction (PCR) products was determined with the previously reported 6 pairs of primers of PCR amplification of 10, 11, 13, 14, 15, and 16 exons of *RET* gene. **Results** No abnormalities were found in exon 10, 13, 14, 15, and 16. C to G replacement in nucleotide 14 996 of exon 11 was identified in DNA samples obtained from both peripheral blood of 2 affected brothers. This missense point mutation arised in heterozygosis and caused a substitution of Cys to Trp residue at codon 634 (Cys 634 Trp) in RET protein. **Conclusion** The genotype of the family is identified as Cys 634 Trp substitution of *RET* gene.

**Key words:** multiple endocrine neoplasia type 2; hyperparathyroidism; medullary thyroid carcinoma; pheochromocytoma; *RET*; gene mutation; gene diagnosis

*Acta Acad Med Sin*, 2006, 28 (6): 799 - 802

多发性内分泌腺瘤 2 型 (multiple endocrine neoplasia type 2, MEN2) 是一种以甲状腺、肾上腺髓质和甲状旁腺内神经内分泌细胞发生增生或肿瘤为主

要特征的常染色体显性遗传病, 临床上分为 MEN2A、MEN2B 和家族性甲状腺髓样癌 3 种亚型, MEN2A 主要累及甲状腺 C 细胞、肾上腺髓质和甲状

\* Department of Endocrinology, Beijing Chaoyang Hospital, Capital University of Medical Sciences, Beijing 100020; # Corresponding author Tel: 010-85231711, Fax: 010-58629156, E-mail: ningzhiwei@medmail.com.cn

旁腺，分别表现为甲状腺髓样癌、嗜铬细胞瘤和甲状旁腺功能亢进；MEN2B 主要表现为甲状腺髓样癌、嗜铬细胞瘤和口唇舌、胃肠道神经瘤和马凡综合征体型<sup>[1]</sup>。

MEN2 由原癌基因 *RET* 突变引起，该基因位于 10 号染色体的中心粒附近，其编码蛋白 RET 是与细胞膜结合的酪氨酸激酶受体，转导某些组织发育（包括由神经嵴发育而来的组织）的生长和分化信号，*RET* 基因的某些突变激活 RET 激酶活性，引起肿瘤发生或转化<sup>[2]</sup>。通过 *RET* 基因突变筛查，可早期发现患病基因型携带者，进行有效的干预治疗，从而改变临床病程、改善预后。本研究通过对 1 个 MEN2A 家系进行 *RET* 基因突变检测，明确该家系 *RET* 基因的基因型。

### 对象和方法

**对象** 先证者（Ⅲ2）为男性，32 岁时因发作性腹痛伴有心悸多汗和进行性消瘦，行腹部 CT 检查发现双侧肾上腺肿瘤。查体发现血压 20/14.7 kPa (150/110 mmHg)，甲状腺左侧可触及一结节、质硬。空腹血糖 8.88 mmol/L，血钙 2.68 mmol/L，血磷、血清碱性磷酸酶正常，甲状旁腺素 171 ng/L，血降钙素 1 268 ng/L，24 h 尿去甲肾上腺素 15.1（正常范围 4.85 ± 2.02）nmol/24 h，肾上腺素 5.44（正常范围 0.75 ± 0.43）nmol/24 h，多巴胺 56.8（正常范围 34.6 ± 16.1）nmol/24h。骨盆和双手 X 线示骨质疏松和左侧输尿管结石。<sup>99m</sup>Tc-甲氧异腈显像显示甲状腺左下极有放射性浓聚。B 超示甲状腺左叶 2.4 cm × 2.3 cm 实性占位伴钙化，右叶多发结节伴钙化。腹部 CT 显示双侧肾上腺占位，左侧 3.9 cm × 4.3 cm，右侧 4.3 cm × 5.6 cm。诊断为 MEN2A，双侧肾上腺嗜铬细胞瘤、甲状腺髓样癌、甲状旁腺功能亢进、左侧输尿管结石。图 1 为该家族的家系图。

先证者于 33 岁时在外院接受双侧肾上腺嗜铬细胞瘤切除术，1 年后左侧肾上腺嗜铬细胞瘤复发，在北京协和医院接受第 2 次肿瘤切除术。同年进行甲状腺左叶全切加右叶大部切除、左甲状旁腺肿瘤切除术，术中见甲状腺明显增大，左右两叶各见一直径 6 cm 和 2 cm 结节，质硬；左侧上、下甲状旁腺呈结节样增生，直径 0.5 ~ 2 cm，质软，术后病理检测结果为甲状腺多发髓样癌、降钙素（+）、甲状腺球蛋白（-）、左甲状旁腺结节样增生。

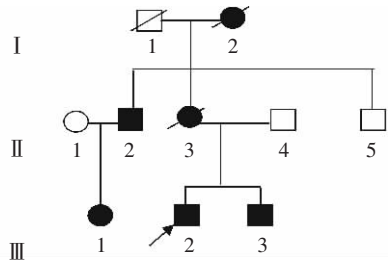


图 1 多发性内分泌腺瘤 2A 型患者家系图

Fig 1 Genealogy of the multiple endocrine neoplasia type 2A kindred

An oblique line denotes deceased family members. The arrow denotes the index case (Ⅲ2) with medullary thyroid carcinoma, pheochromocytoma, and parathyroid

腺瘤。先证者的弟弟（Ⅲ3），27 岁时腹部 CT 检查发现左肾上腺肿瘤。血压 14.7/12 kPa (110/90 mmHg)，甲状腺有结节。24 h 尿去甲肾上腺素 11 nmol/24 h，肾上腺素 3.74 nmol/24 h，多巴胺 120.2 nmol/24 h，血钙 2.58 mmol/L，甲状旁腺素 119 ng/L，血降钙素 633.9 ng/L。甲状腺 B 超：甲状腺左叶 2.4 cm × 2.3 cm 实性占位伴钙化，右叶多发结节伴钙化。诊断：MEN2A、肾上腺嗜铬细胞瘤、甲状腺髓样癌、甲状旁腺机能亢进。

家族中其外祖母、母亲、一舅舅和表妹均有颈部肿大史，其余情况不详，外祖母和母亲已故，母亲死于高血压、糖尿病和心肌梗死。

正常对照 5 人，均无甲状腺髓样癌、嗜铬细胞瘤和甲状旁腺功能亢进。

**方法** 收集受试者外周血白细胞，提取基因组 DNA，用 PCR 方法对 *RET* 基因的第 10、11、13、14、15 和 16 外显子进行扩增。引物由上海博亚生物技术有限公司合成，引物序列外显子 10 来源于文献<sup>[3]</sup>，其余序列来源于其他文献<sup>[4]</sup>（表 1）。反应体系 50 μl，其中含有 100 ng 基因组 DNA 模板，50 ng（约 10 μmol/L × 1 μl）引物，200 μmol/L (2.5 mmol/L × 4 μl) dNTPs，1.5 U (5 U/μl × 0.3 μl) pfu Taq 酶，10 × buffer 5 μl [1 × buffer 含 67 mmol/L Tris (pH 8.8)，6.7 mmol/L MgCl<sub>2</sub>，10 mmol/L β-巯基乙醇，6.7 μmol/L EDTA (pH 8.0) 和 16.6 mmol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>]。

PCR 产物用 DNA 超薄型纯化试剂盒纯化（清华大学天为时代公司）后，由上海博亚生物技术有限公司进行 *RET* 基因序列测定，所有样品均双向测序。

表 1 PCR 实验所用引物  
Table 1 Primers for PCR test

Exon	Name	Sequence	Product size (bp)
Exon 10	Ret 10F	5'-GGGGCAGCATTTGTTGGGGGAC-3'	148
	Ret 10R	5'-CGTGGTGGTCCCGGCCCC-3'	
Exon 11	Ret 11F	5'-CCTCTGCGGTGCCAAGCCTC-3'	190
	Ret 11R	5'-TCCGGAAGTTCATCTCAGCT-3'	
Exon 13	Ret 13F	5'-GCAGGCCTCTCTGTCTGAAC-3'	295
	Ret 13R	5'-GGAGAACAGGGCTGTATGGA-3'	
Exon 14	Ret 14F	5'-GGAAGACCCAAGTGCCTGA-3'	330
	Ret 14R	5'-GTGGTGGGTCAGGTGTGGC-3'	
Exon 15	Ret 15F	5'-TCTGCTGGTCCACCCAGGCT-3'	293
	Ret 15R	5'-CGGTATCTTTCCTAGGCCTC-3'	
Exon 16	Ret 16F	5'-AGGATAGGGCCTGGCCCT-3'	192
	Ret 16R	5'-TAACCTCCACCCAAGAG-3'	

结 果

先证者的第 10、13、14、15 和 16 外显子区均无异常，第 11 外显子的第 14 996 位核苷酸存在 C-G 替代（图 2）；其反义链测序为 14 996 G-C 替代（图 3）。这种替代（TGC-TGG）使对应编码的氨基酸由半胱氨酸突变为色氨酸（Cys 634 Trp, C 634W）。先

证者弟弟（Ⅲ3）的 RET 基因测序结果与先证者完全相同。正常对照 RET 基因第 10、11、13、14、15 和 16 外显子区域均未见异常。

讨 论

由于甲状腺髓样癌是 MEN2A 的最常见表现，血清降钙素水平升高是其最早的表现，因此以往应用血清降钙素水平进行 MEN2 早期筛查，但降钙素水平检测的假阳性率高达 5% ~ 10% [5]。与血清降钙素水平相比，RET 基因突变检测具有较高的特异性，基因携带者外显率几乎百分之百；在个体出生时甚至出生前、临床症状出现前即可筛查出是否携带致病基因，可超早期诊断 MEN2；由于目的密码子数目较少，突变的检出率较高 (>95%) [5,6]。

不同基因型具有不同表现型，可以根据基因型的不同判断预后和指导早期治疗 [7]。由于甲状腺髓样癌是 MEN2A 的主要死亡原因，如果在甲状腺髓样癌发生前甚至甲状腺 C 细胞增生前早期切除甲状腺组织，然后给予甲状腺激素替代治疗可以预防甲状腺髓样癌的发生，明显改善 MEN2A 患者的预后。目前根据 RET 突变位点不同把甲状腺髓样癌分成 3 个危险层次，每一种危险水平的处理不尽相同 [8~10]。因此，通过 RET 基因突变筛查，可早期发现患病基因型携带者，进行有效地干预治疗。

634 位密码子突变为 MEN2 最常见的突变类型，占 MEN2 的 80%，MEN2A 的 87% [5]。目前文献报道的密码子替代突变类型有 7 种 [11]，分别为 TGC-CGC, Cys-Arg; TGC-GGC, Cys-Gly; TGC-TTC, Cys-Phe; TGC-AGC, Cys-Ser; TGC-TCC, Cys-Ser; TGC-TGG, Cys-Trp; TGC-TAC Cys-Tyr。最常见的替代是

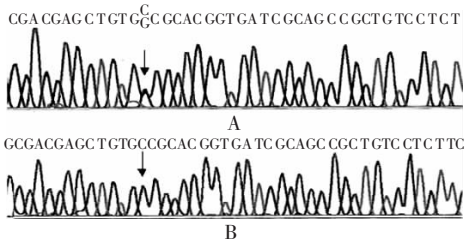


图 2 RET 基因第 11 外显子的正向测序结果  
Fig 2 Sequencing result of exon 11 of RET gene in forward direction

Nucleotide 14 996 heterozygosis C-G was identified in the proband and carrier in contrast to control case' 14 996 homozygosis C

A. control; B. proband

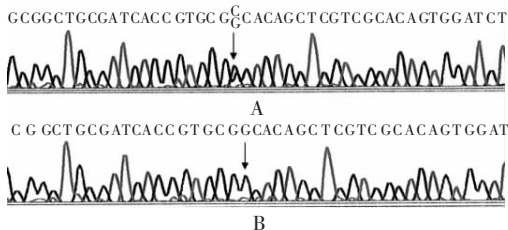


图 3 RET 基因第 11 外显子的反向测序结果  
Fig 3 Sequencing results of exon 11 of the RET gene in reverse direction

Nucleotide 14 996 heterozygosis G-C was identified in the proband and carrier in contrast to control case' 14 996 homozygosis G

A. control; B. proband

精氨酸替代半胱氨酸 (C634R), 见于 50% 的患者<sup>[5]</sup>。国内有一关于 MEN2 型基因突变的报道, 为 Cys 634Gly, 临床表现为甲状腺髓样癌和肾上腺嗜铬细胞瘤, 无甲状旁腺功能亢进表现<sup>[12]</sup>。RET 基因型 C634W 引起 MEN2A 在中国人群中未见报道。

本研究通过对该 MEN2A 家系的临床和 RET 基因突变分析, 明确了引起该家系 MEN2A 表现的分子遗传学基础是 RET 基因第 11 外显子的第 634 位密码子突变, 从而使第 634 位半胱氨酸 (Cys) 被色氨酸 (Trp) 替代。为其他家系成员的筛查提供了方便, 由于患病的两个兄弟均未生育, 基因型的明确有助于以后进行产前基因诊断。

(志谢: 感谢中国医学科学院基础医学研究所刘国仰教授、施惠平教授和北京协和医院外科管珩教授的指导)

### 参 考 文 献

- 1 Hoff AO, Cote GJ, Gagel RF. Multiple endocrine neoplasias. *Annu Rev Physiol*, 2000, 62(1):377-411.
- 2 Thakker RV. Multiple endocrine neoplasia. *Horm Res*, 2001, 56(Suppl 1):67-72.
- 3 Siegelman M, Mohabeer A, Fahey TJ, *et al*. Rapid, nonradioactive screening for mutations in exons 10, 11, and 16 of the RET protooncogene associated with inherited medullary thyroid carcinoma. *Clin Chem*, 1997, 43 (3):453-457.
- 4 Menko FH, van der Luijt RB, de Valk IA, *et al*. Atypical MEN type 2B associated with two germline RET mutations on the same allele not involving codon 918. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(1):393-397.
- 5 Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, *et al*. Consensus: guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86 (12):5658-5671.
- 6 Carling T. Multiple endocrine neoplasia syndrome: genetic basis for clinical management. *Curr Opin Oncol*, 2005, 17(1):7-12.
- 7 Frilling A, Weber F, Tecklenborg C, *et al*. Prophylactic thyroidectomy in multiple endocrine neoplasia: the impact of molecular mechanisms of RET proto-oncogene. *Langenbecks Arch Surg*, 2003, 388:17-26.
- 8 Heizmann O, Haecker FM, Zumsteg U, *et al*. Presymptomatic thyroidectomy in multiple endocrine neoplasia 2a. *Eur J Surg Oncol*, 2006, 32 (1):98-102.
- 9 Danko ME, Skinner MA. Surgical intervention in children with multiple endocrine neoplasia type 2. *Curr Opin Pediatr*, 2006, 18 (3):312-315.
- 10 Hubner RA, Houlston RS. Molecular advances in medullary thyroid cancer diagnostics. *Clin Chim Acta*, 2006, 370 (1-2):2-8.
- 11 Carney JA. Familial multiple endocrine neoplasia: the first 100 years. *Am J Surg Pathol*, 2005, 29(2):254-274.
- 12 韩战营, 张奎星, 高平进, 等. 一个 II 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.

(2006-03-06 收稿)