

## 68例中国新疆多民族地区遗传性乳腺癌患者 BRCA1和BRCA2突变研究\*

欧江华<sup>①</sup> 吴涛<sup>①</sup> 倪多<sup>①</sup> 许文婷<sup>①</sup> 陈玲<sup>①</sup> 哈木拉提·吾甫尔<sup>②</sup>

**摘要** 目的:分析中国新疆多民族地区的高风险遗传性乳腺癌BRCA1/2基因突变位点情况。方法:以2009年1月到2010年12月新疆医科大学附属肿瘤医院收治的来自新疆地区的68例符合高风险遗传性乳腺癌标准的患者为研究对象,其中HBC 12例,HBOC 4例,E-BC 25例,BI-BC 10例,TNB 17例。通过外周静脉血提取基因组DNA,对BRCA1/2基因的全部编码序列进行扩增。用高效液相色谱分析(DHPLC)进行突变分析预筛,结果经DNA测序验证。结果:BRCA1/2致病性突变在新疆地区高风险遗传性乳腺癌的突变率为8.8%(6/68)。其中BRCA1的突变率为4.4%(3/68),BRCA2的突变率为4.4%(3/68)。不同民族之间BRCA1/2突变率无统计学差异。结论:中国新疆多民族地区的高风险遗传性乳腺癌患者部分病例具有与内地汉族人群不同的BRCA基因突变谱。BRCA1 2073delA, BRCA2 6873del CTCC及BRCA2 9481del A可能是新疆遗传性乳腺癌特有的突变位点。

**关键词** 乳腺癌 BRCA1 BRCA2 民族 遗传易感性

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.20.021

## BRCA1 and BRCA2 Deleterious Mutations in 68 Patients with Hereditary Predisposition to Breast Cancer among Multiple Ethnic Groups in Xinjiang

Jianghua OU<sup>1</sup>, Tao WU<sup>1</sup>, Duo NI<sup>1</sup>, Wentin XU<sup>1</sup>, Lin CHEN<sup>1</sup>, Upur Halmurat<sup>2</sup>

Correspondence to: Upur Halurat; E-mail: halmurat@263.net

<sup>1</sup>Department of Breast Surgery, Xinjiang Cancer Institute and Hospital, 2Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30960435)

**Abstract Objective:** This study aimed to investigate the prevalence and spectrum of the BRCA1/2 gene mutation in high-risk breast cancer cases among multiple ethnic groups in Xinjiang, China. **Methods:** A total of 68 high-risk breast cancer cases from Xinjiang were included in this study according to the following inclusion criteria: 12 hereditary predisposition to breast cancer (HBC) cases (at least one first- or second-degree relative with breast cancer), 4 hereditary predisposition to breast and ovarian cancer cases (at least one first- or second-degree relative with ovarian cancer), 25 early-onset breast cancer cases (onset age below 35 years), 10 bilateral breast cancer cases, and 17 triple-negative breast cancer cases (onset age below 45 years). Genomic DNA was extracted and relevant coding sequences were amplified by PCR. The entire coding BRCA1/2 genes were analyzed by DHPLC followed by DNA sequencing. **Results:** A total of six deleterious mutations were identified: three in BRCA1 and three in BRCA2. The prevalence of BRCA1/2 mutation in high-risk HBC was 8.8% (6/68). No significant difference was observed among the ethnic groups in terms of BRCA1/2 mutation prevalence. **Conclusion:** High-risk HBC cases had different BRCA mutation spectra from ethnic Chinese breast cancer cases in Xinjiang, China.

**Keywords** Breast cancer; BRCA1; BRCA2; Ethnic; Genetic predisposition

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一。10%~15%的乳腺癌有家族遗传背景,部分是由于高外显率BRCA1/2基因突变造成的。BRCA1/2基因属于抑癌基因,由于环境和遗传因素的差异在不同研究人群中突变的分布差异很大。普通人群患乳腺癌的危险度为10%~14%<sup>[1]</sup>,而BRCA基因突变女性携带者发生相关肿瘤的危险度为80%~90%<sup>[2]</sup>。中国人群相

关的全序列研究很少,且多集中在汉族人群,目前尚未发现中国人特有的突变位点。本研究针对新疆不同民族遗传性乳腺癌,分析BRCA1/2基因突变情况及在新疆人群中的携带情况。

### 1 材料与方法

#### 1.1 研究对象

2009年1月至2010年12月,符合以下任何一项

作者单位:①新疆医科大学附属肿瘤医院乳腺外科(乌鲁木齐市830011);②新疆医科大学

\*本文课题受国家自然科学基金项目(编号:30960435)资助

通信作者:哈木拉提·吾甫尔 halmurat@263.net

高风险遗传性乳腺癌标准的乳腺癌患者被纳入本研究:1)至少2个一级或二级亲属患乳腺癌疾病(HBC);2)家族中一级或二级亲属同时发生乳腺癌和卵巢癌(HBOC);3)发病年龄 $\leq 35$ 岁的早发性乳腺癌(E-BC);4)同时或先后发生的双侧原发性乳腺癌(BI-BC);5)发病年龄 $\leq 45$ 岁的三阴性乳腺癌(TN-BC)。其中:HBC 12例,HBOC 4例,E-BC 25例,BI-BC 10例,TNBC 17例。汉族44例,非汉族24例,所有入组患者均签署了BRCA1和BRCA2基因检测知情同意书,该研究获得新疆医科大学附属肿瘤医院伦理委员会批准。

## 1.2 DNA提取和PCR检测

用中量全血基因组DNA提取试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司)按照试剂盒说明书从3 mL外周血中提取基因组DNA。BRCA1/2的编码区,外显子内含子拼接区,5'和3'端非翻译区用聚合酶链反应进行扩增。BRCA1扩增的35对引物和BRCA2扩增的43对引物由北京表观生物技术公司合成引物序列。PCR体系:总体积25  $\mu$ L的PCR反应体系包括以下成分:dH<sub>2</sub>O 16.9  $\mu$ L,10 $\times$ Buffer 2.5  $\mu$ L,Mg<sup>2+</sup>0.5  $\mu$ L,dNTP 2.0  $\mu$ L,5'引物(10p)1.0  $\mu$ L,3'引物(10p)1.0  $\mu$ L,DNA(50  $\mu$ g/ $\mu$ L)1.0  $\mu$ L,TagDNA聚合酶(0.1)10.5  $\mu$ L。

## 1.3 变性高效液相色谱分析(DHPLC)和DNA测序

扩增成功的PCR产物用WAVE<sup>®</sup>核酸片断分析系统(Transgenomic, Omaha, USA)进行突变的预筛,对出现异常峰型的样品另外取样进行第二次PCR扩增,反应体系为50  $\mu$ L,温度及循环条件如前,扩增片断用ABI PRISM<sup>®</sup>3700(PE Applied Biosystems)测序仪进行正反向测序,测序图形用Chro-masPro 1.33软件分析,所有核酸序列编码与GenBank数据库中的U14 680.1(BRCA1)和U43746.1(BRCA2)序列进行比对。突变的位点在乳腺癌信息中心网站数据库(Breast Cancer Information Core, BIC)对照,确定是否为新的突变,碱基插入和丢失根据HUGO推荐的规则命名。本研究的DHPLC检测和DNA测序及图形分析由北京表观生物技术公司协助完成。

## 1.4 统计学分析

使用SPSS 16.0软件进行统计分析。BRCA1和BRCA2突变频率用Fisher's精确法进行比较。双侧检验以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般资料

68例符合遗传性乳腺癌标准的患者中汉族44例,维吾尔族、哈萨克族等其他民族24例,检测出6例致病性突变患者,3例为汉族患者,3例为非汉族患者(2例哈萨克族,1例为维吾尔族,表1)。

从民族分布来看,其中哈萨克族2例(平均发病年龄为38.5岁,均为BRCA2突变,组织学分级均为8分,分子亚型为Luminal B型),维吾尔族1例(发病年龄为35岁,为BRCA1突变,组织学分级为Ⅲ级8分,分子亚型为三阴性)。汉族3例(平均发病年龄为40.6岁,组织学分级平均为Ⅱ级7分,分子亚型均为三阴性,2例为BRCA1突变,1例为BRCA2突变)。新疆地区不同民族遗传性乳腺癌BRCA1/2基因突变率无统计学差异。

表1 不同民族BRCA1/2突变率的比较 例(%)

Table 1 Comparison of BRCA1/2 gene mutation prevalence among individuals with breast cancer from multiple ethnic groups

项目	汉族(n=44)	非汉族(n=24)	P
BRCA1阳性	2(4.5)	1(4.2)	0.942
BRCA2阳性	1(2.3)	2(8.3)	0.258
BRCA1/2阳性	3(6.8)	3(12.5)	0.439

## 2.2 BRCA1和BRCA2的突变谱

6例致病性突变患者病理组织学分级均为Ⅱ级6分以上,平均组织学分级为7.5分。其中三阴性乳腺癌患者4例(66.6%,4/6)。6例致病性BRCA突变患者平均发病年龄为39岁,中位发病年龄为36岁。本研究中3例BRCA1突变者均为三阴性乳腺癌患者,3例BRCA2突变者仅有1例(1/3)为三阴性乳腺癌患者且为汉族。

对BRCA1/2两个基因的所有编码区以及BRCA1的24个外显子和BRCA2的26个外显子和内含子交接区域都进行了检测,结果共发现6例致病性突变(表2),其中3例位于BRCA1,3例位于BRCA2。3例致病性突变是移码突变(图1A、E、F)导致蛋白质翻译的提前终止,在BIC数据库中未见报道。3例单个碱基替换,其中2例为无义突变(图1B、D),1例为剪切位点的突变(图1C)。此3例在BIC数据库中可见报道。在中国汉族人群中出现的重复突变(BRCA1 1100delAT和5589del8)在该组病例中未被检测到。所以致病性BRCA突变在新疆地区高风险遗传性乳腺癌中的突变率为8.8%(6/68)。其中BRCA1的突变率为4.4%(3/68),BRCA2的突变率为4.4%(3/68)。

此外还有3例病理意义不明的突变,在BIC数据库中未见报道,其中1例位于BRCA1基因5'-UTR区,位于mRNA前,导致CG-TG的转换,可能会影响CpG岛的功能。第二例为BRCA2 6529 delAATGTA,为两个氨基酸的缺失,但未造成移码突变。第三例为BRCA1第16号外显子同时出现3个错义突变,分别为D1582G,S1598Y及S1631G。

表2 新疆不同民族遗传性乳腺癌BRCA1和BRCA2基因的致病性突变

Table 2 BRCA1 and BRCA2 gene pathogenic mutations in high-risk breast cancer cases among multiple ethnic groups in Xinjiang region

编号	族别	发病年龄(岁)	基因	突变位置	核酸改变	突变类型	氨基酸改变	家族史	肿瘤组织分级	BIC有无报告
1	汉	36	BRCA1	11E	2073delA	Frame shift	Stop	有	Ⅲ级8分	无
1	汉	44	BRCA1	11	2394C-T	Nonsense mutation	Q759X	有	Ⅲ级7分	有
3	维	35	BRCA1	1~16	IVS16+1G>A	Splice-site	No	无	Ⅲ级8分	有
4	汉	42	BRCA2	10	1627A-T	Nonsense mutation	Lys to Stop	无	Ⅲ级6分	有
5	哈	42	BRCA2	11 M	6873delCTCC	Frame shift	Stop	有	Ⅲ级8分	无
6	哈	35	BRCA2	24	9481delA	Frame shift	Stop	无	Ⅲ级8分	无

GeneBank参照: BRCA1, U14680; BRCA2, U43746; Frame shift: 移码突变; Splice-site: 拼接点突变; Nonsense mutation 无义突变; IVS: 内含子; Lys 赖氨酸; Gln 谷氨酰胺 A: 腺嘌呤; G: 鸟嘌呤; C: 胞嘧啶; T: 胸腺嘧啶; IVS16+1G>A: 在第16号内含子区基因拼接点向下1bp的位置碱基G变为A; BIC 乳腺癌信息中心数据库

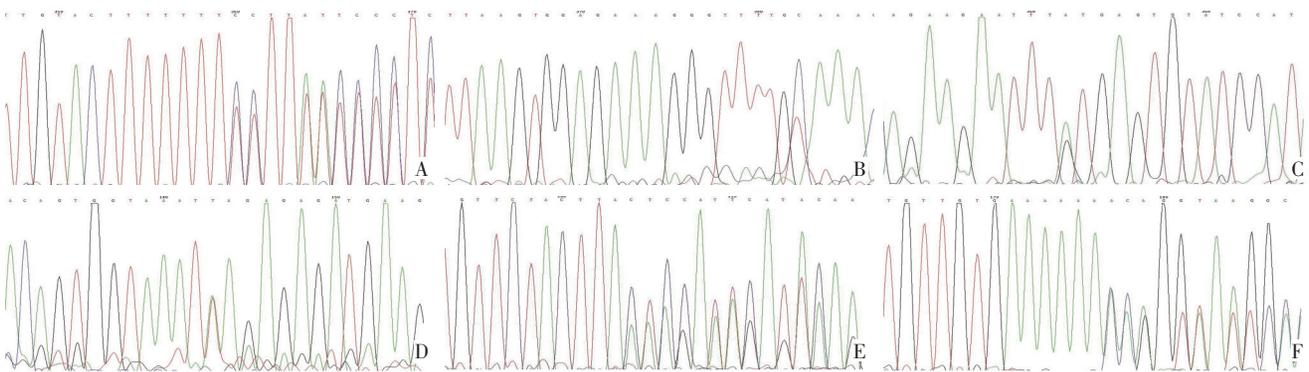


图1 BRCA1/2的6例致病性突变

Figure 1 Frameshift mutation of BRCA1 11E 2073delA

### 3 讨论

10%~15%的乳腺癌有家族遗传背景,部分是由于高外显率基因BRCA1和BRCA2突变造成的。因为遗传背景的差异和是否存在始祖突变,不同种族人群BRCA1和BRCA2突变率差别很大。在一些特定人群中,特定类型的突变出现频率很高,称之为“始祖效应”(founder effect)。最著名的“始祖效应”见于Ashkenazi Jews中,其最常见的始祖突变为:BRCA1 185delAG、5382insC和BRCA2 6174delT,携带率分别为1%、0.13%和1.52%。上海复旦大学肿瘤医院对乳腺癌BRCA1/2基因突变研究,发现了BRCA1 1100delAT和BRCA1 5589del8在汉族人群中可能具有部分始祖效应<sup>[3]</sup>。新疆维吾尔自治区是中国维吾尔族聚集地区,总人口2 181.33万人,其中以维吾尔族为主的各少数民族占59.90%,汉族占40.10%<sup>[4]</sup>。新疆多民族地区BRCA1/2基因突变谱研究较少,是否少数民族存在不同于汉族的始祖突变未见报道。

本研究发现了6例BRCA基因的病理性突变,其中3例汉族患者,1例维吾尔族患者,2例哈萨克族患者,均未发现国内报道的在中国汉族人群中可能具有部分始祖效应的BRCA1 1100delAT和BRCA1 5589del8

的突变。2例BRCA1突变:1例汉族患者的394C-T(Q759X)突变,1例维吾尔族患者IVS16+1G>A及1例汉族患者BRCA2突变2394C-T)在国际BIC数据库可见报道,但主要集中在西欧人群及亚洲韩国,及印度人群,此次是首先在中国人群中发现这3例突变。此外,有趣的是,本研究发现了3例国际BIC数据库未见报道的BRCA突变<sup>[5]</sup>,其中1例为BRCA1突变(BRCA1 2073delA,发病年龄为36岁的汉族乳腺癌,母亲为卵巢癌患者),其余2例为BRCA2突变(1例为BRCA2 6873delCTCC的42岁哈萨克族双乳腺癌患者,父母均患恶性肿瘤。另1例为BRCA2 9481delA的35岁早发性哈萨克族乳腺癌患者)。6例BRCA基因病理性突变(包括3名汉族患者)均未在中国人群中报道。初步推测新疆多民族地区的高风险遗传性乳腺癌患者部分病例具有与内地汉族人群不同的BRCA基因突变谱。

多数西方研究表明,BRCA1基因突变相关性乳腺癌具有与散发性乳腺癌完全不同的病理学特征,与后者相比,具有髓样癌及Luminal A亚型比例高、肿瘤细胞分级高的特点<sup>[6]</sup>。但本研究3例BRCA1病理性突变均为三阴性乳腺癌,细胞分级均为7~8

(下转第1546页)