

doi:10.3969/j.issn.1671-038X.2017.05.02

散发性大肠腺瘤性息肉患者粪便中 APC 基因突变的意义及与中医体质的关系

刘 杨¹, 巩 阳¹, 林一帆¹, 杨 卓², 冯玉霞¹

¹沈阳军区总医院中医科 国家中西医结合消化病重点学科, 辽宁 沈阳 110840;

²沈阳军区总医院 内镜中心, 辽宁 沈阳 110840)

摘要:[目的]观察粪便中散发性大肠腺瘤性息肉 APC 基因突变的意义,探讨易出现 APC 基因突变的中医体质类型。[方法]采用 QIAamp DNA Stool Mini Kit 51504 提取 42 例大肠腺瘤性息肉、8 例非腺瘤性息肉、12 例大肠癌患者及 23 例正常人群粪便的 DNA,运用聚合酶链反应-单链构象多态分析法(PCR-SSCP)检测 APC 基因的突变情况;通过问卷形式调查散发性大肠息肉患者的中医体质类型。[结果]42 例大肠腺瘤性息肉患者的粪便 APC 基因的突变率为 21.43%(9/42);8 例非腺瘤性息肉及 23 例正常组 APC 基因的突变率均为 0;12 例大肠癌患者粪便中 APC 基因突变率为 33.33%(4/12);总突变率为 15.30%。腺瘤性息肉组与正常组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);腺瘤性息肉与大肠癌组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。粪便 APC 基因突变与中医体质无关($P > 0.05$)。[结论]检测粪便中 APC 基因的突变率有助于大肠腺瘤性息肉筛查,大肠腺瘤性息肉粪便中 APC 基因的突变与中医体质无明显关系。

关键词:大肠腺瘤性息肉;粪便;APC 基因;中医体质

中图分类号:R574

文献标志码:A

文章编号:1671-038X(2017)05-0327-05

Significance of APC gene mutation in stool of sporadic colorectal adenoma patients and its relationship with TCM body constitution

LIU Yang¹, GONG Yang¹, LIN Yi-fan¹, YANG Zhuo², FENG Yu-xia¹

¹Department of Traditional Chinese Medicine and Gastroenterology, Hospital of Shenyang Military District, Shenyang 110840, China; ²Department of Endoscopy Center, Hospital of Shenyang Military District, Shenyang 110840, China)

Corresponding author: LIN Yi-fan, E-mail: 13309888130@163.com

Abstract:[Objective]To investigate the significance of APC gene mutation in sporadic colorectal polyps in feces, and to explore the TCM constitution type of APC gene mutation. [Methods]QIAamp DNA Stool Mini Kit 51504 was used for 42 cases of colorectal adenoma polyps, 8 cases of none adenoma polyp, 12 cases of patients with colorectal carcinoma and 23 cases of normal people fecal DNA extraction, polymerase chain reaction single stranded conformation polymorphism analysis was used to detect the APC gene mutation, and questionnaire survey was conducted among sporadic colonic polyps patients to estimate the TCM Constitution type. [Results]Fecal APC gene mutation rate was 21.43% (9/42) in 42 cases of colorectal adenomatous polyps patients; APC gene mutation rate was 0 in 8 patients with non adenomatous polyps and 23 cases of normal group; 12 cases of APC gene in stool of patients with colorectal cancer mutation rate was 33.33% (4/12); total mutation rate of 15.30%. There was significant difference between the normal group and the abnormal (colorectal adenoma) group ($P < 0.05$). There was no significant difference in the contrast between the colorectal adenoma group and the large bowel carcinoma ($P > 0.05$). The mutation of APC gene in feces

收稿日期:2016-07-20

基金项目:辽宁省科技发展攻关计划项目(No:2013225089)

作者简介:刘 杨,女,副主任医师,主要从事消化道疾病的中西医结合研究

通讯作者:林一帆, E-mail: 13309888130@163.com

was not correlated with traditional Chinese medicine body constitution ($P > 0.05$). [Conclusion] Detection of the mutation rate of APC gene in feces is helpful to the screening of colorectal adenoma, and the mutation of APC gene in colorectal adenoma polyps has no significant relationship with TCM body constitution.

Key words: colon polyps; Feces; APC gene; constitution of traditional Chinese Medicine

大肠腺瘤性息肉发病率逐渐升高,具有癌变风险,93%的大肠癌源自于腺瘤性息肉,及时筛查、遏止腺瘤于癌变前期可提高患者生存率。文献报道大肠息肉的检出率为10%~60%^[1],差距较大,改善检测方法可有效提高检出率。目前粪便中检测特定基因进行疾病筛查,尤其是结肠癌的检测,拥有取材方便、依从性好,敏感性及特异性相对较高的特点,具有潜在价值。APC基因又称家族性腺瘤性息肉病基因,不仅是家族性腺瘤性息肉病(FAP)的致病基因,同时也与散发性结直肠癌的发生相关^[2]。而己成为公认癌前病变的散发性大肠腺瘤性息肉与APC基因突变的相关性及突变率研究较少,本文通过纯化、扩增粪便中的APC基因,以探讨散发性腺瘤性息肉APC基因的突变情况。此外,目前“证候—体质—基因组学”模式已成为研究热点,APC基因突变与中医体质的关系也是本文所要探讨的问题之一。

1 资料与方法

1.1 标本来源

收集2014年3月1日~4月13日于沈阳军区总医院中医科、内窥镜科、消化科病房及内窥镜门诊行肠镜检查及治疗前100例患者的粪便,其中包括42例大肠腺瘤性息肉、8例非腺瘤性息肉、12例大肠癌患者及23例肠镜检查正常者,15例患者不同意行病理检查而剔除,62例患者病理类型经沈阳军区总医院病理科确诊。被调查者中男49名,女36名,平均年龄(59.38±11.01)岁。收集受检者肠镜检查前的新鲜大便,立即放于-20℃冰箱,24h后转移至-80℃冰箱保存。

同时通过调查问卷方式对上述100例受检者进行中医体质调查,中医体质类型参照《中医体质分类与判定》(2009年中华中医药学会)的9种体质进行分类^[3],包括气虚质、气郁质、阳虚质、阴虚质、湿热质、瘀血质、痰湿质、平和质、特禀质,并据相应判定方法及标准进行中医体质判定。判定方法回答《中医体质分类与判定表》中的全部问题,每一问题按5级评分,计算原始分及转化分,依标准判定体质类型。原始分=各个条目分值相加;转化分数=[(原始分-一条目数)/(条目数×4)]×100。判定标准:平和质为正常体质,其他8种体质为偏颇体质。判定平和质的条件:转化分≥60分,其他8种体质转化

分均<30分,可判定为是;转化分≥60分,其他8种体质转化分均<40分,判定为基本是;不满足上述条件者为否;偏颇体质:转化分≥40分,判定为是;转化分30~39分,判定为倾向是;转化分<30分为否。

1.2 纳入标准

留取的粪便为肠镜检查前的标本;粪便标本量不少于180mg;粪便常温下放置时间较长者;能自行填写或在调查员的帮助下完整填写体质调查表。

1.3 排除标准

不符合纳入标准;家族性腺瘤性息肉病,加德纳综合征,特科特综合征,幼年性息肉病综合征;已行大肠息肉切除术者;不同意参与本次调查者;体质调查表填写不完全者。

1.4 研究方法

1.4.1 粪便DNA的提纯

1)称取180~220mg样品2ML EP管中,置于冰上。

2)每管加1.6ml Buffer ASL,涡旋1min。

3)全速离心1min,沉淀颗粒。

4)取1.4ml上清液到新的2ml EP管中,弃掉沉淀。

5)放一块Inhibit EX Tablet到每个管中,立即涡旋1min,室温孵育1min。

6)全速离心3min,沉淀颗粒和药片。

7)离心停止后,立即吸取上清液到新1.5小离心管中,弃掉沉淀。全速离心3min。

8)取25μl proteinase K到新的2ml EP管中。

9)吸取600μl步骤7的上清液到装有proteinase K的EP管中。

10)加600μl Buffer AL,涡旋15s。

11)70°孵育10min。

12)加600μl乙醇(96%~100%)到溶解产物中,涡旋混匀。

13)取柱子放到2ml收集管中,小心吸取600μl上一步骤的溶解产物到柱子中,盖上盖,全速离心1min。离心后,将柱子放到2ml收集管中,弃掉旧的收集管。

14)小心打开柱子盖,从剩余的溶解产物中再吸取600μl到柱子中,全速离心1min。离心后,将柱子放到新的2ml收集管中,弃掉旧的收集管。

15)重复上一步骤,直到所有溶解产物通过柱子。

16)小心打开柱子盖,加 500 μ l Buffer AW1,全速离心 1 min。离心后,将柱子放到新的 2 ml 收集管中,弃掉旧的收集管。

17)小心打开柱子盖,加 500 μ l Buffer AW2,全速离心 3 min。离心后,弃掉旧的收集管。注意:残留的 Buffer AW2 会对后续的步骤产生影响,所以从离心机取出柱子时应防止 Buffer AW2 再次沾到柱子。

18)将柱子放到新的 2 ml EP 管中,弃掉旧的收集管。全速离心 1 min。

19)将柱子放到新的 1.5 ml EP 管中,吸取 200 μ l Buffer AE 到收集管薄膜中央,室温孵育 1 min。全速离心 1 min。

20)离心管中液体即为提取的 DNA。

21) -20 $^{\circ}$ C 保存。

1.4.2 引物设计

引物由北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司合成,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	引物(5'-3')		扩增片段长度/bp
	上游	下游	
APC	AGTACAACCATGCCAATATTATG	ACTTCTATCTTTTTCAGAACGAG	399

1.4.3 APC 基因的 PCR 扩增及单链构象多态分析(SSCP)

1)制备 6%的非变性聚丙烯酰胺凝胶:30%聚丙烯酰胺(交联度 49:1)10 ml,5 \times TBE 缓冲液 10 ml,加蒸馏水至 50 ml,加 TEMED 25 ml、10%过硫酸铵 250 ml,混匀后灌胶,插入加样梳子。待胶完全聚合后,拔出加样梳子,安装电泳装置,加入电泳缓冲液(1 \times TBE),缓冲液应高于加样孔上缘,用注射器吸取缓冲液冲净加样孔。

2)取 5 ml 扩增产物加 10 ml 变性上样缓冲液混匀,98 $^{\circ}$ C 变性 10 min,迅速冰浴。

3)取 5 ml 混合液加到点样孔中,以 1~8 V/cm 电泳 4~5 h。

4)拆下电泳装置,取出聚丙烯酰胺凝胶,放到一个塑料盘内,用蒸馏水冲洗 1~2 遍。

5)倒入固定液,固定 8~10 min。

6)用蒸馏水冲洗 1~2 遍;倒入银染液,银染 10~12 min。

7)用蒸馏水冲洗若干遍;倒入显色液,显色至出现清晰的银染带。

8)用蒸馏水浸泡聚丙烯酰胺凝胶,观察 PCR-SSCP 结果。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,2 组间计数资料运用 χ^2 检验比较分析;以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大肠腺瘤性息肉患者的粪便中 APC 基因的突变率为 21.43%(9/42);非腺瘤性息肉组及

正常组 APC 基因的突变率均为 0;大肠癌组患者粪便中 APC 基因突变率为 33.33%(4/12);总突变率为 15.30%。腺瘤性息肉组与正常组比较差异有统计学意义($P < 0.05$);腺瘤性息肉组与大肠癌组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2、表 3。APC 基因突变如图 1 所示。

表 2 腺瘤性息肉患者与正常人群粪便中 APC 基因突变率比较

组别	例数	突变例数	未突变例数	突变率/%
腺瘤性息肉组	42	9	33	21.43 ¹⁾
正常组	23	0	23	0

与正常组比较,¹⁾ $P < 0.05$ 。

表 3 腺瘤性息肉与大肠癌患者粪便中 APC 基因突变率比较

组别	例数	突变例数	未突变例数	突变率/%
腺瘤性息肉组	42	9	33	21.43
大肠癌组	12	4	8	33.33

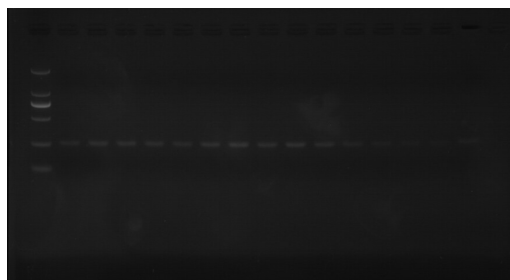


图 1 APC 基因扩增电泳图

2.2 腺瘤性息肉患者的主要体质类型

阳虚质(35.71%)、气虚质(16.67%);粪便中 APC 基因突变患者的主要体质类型为阳虚质、气虚

质、湿热质,APC 基因无突变者的主要体质类型为阳虚质、气虚质;二者比较差异无统计学意义($\chi^2 = 4.332, P > 0.05$)。见表4。

表4 腺瘤性息肉患者粪便中 APC 基因突变情况与中医体质类型的关系

腺瘤性息肉组 APC 基因突变情况	体质类型								
	阳虚质	气虚质	阴虚质	痰湿质	湿热质	血瘀质	气郁质	特禀质	平和质
突变	4	2	0	1	2	0	0	0	0
未突变	11	5	6	3	3	0	0	0	5
合计	15	7	6	4	5	0	0	0	5

3 讨论

大肠腺瘤性息肉癌变风险高,在腺瘤致癌过程中,APC 基因→K-ras 基因→DCC 基因→p53 基因分阶段参与了整个癌变过程^[4],为目前所公认。APC 基因在癌组织的突变率达 70%~80%,但有学者认为 APC 基因突变发生在腺瘤期而非肠癌期^[5],而关于腺瘤性息肉 APC 基因突变率研究较少,为 25%~56%^[5-6]。研究认为大肠息肉的发生与 APC 基因突变相关。APC 基因作为抑癌基因与 Axin/Axin2、CSNK1A1 和 GSK-3 B 结合形成的“毁灭复合物”可促进 β -catenin 磷酸化^[7]及后续蛋白降解,从而降低 β -catenin 浓度,抑制 Wnt 信号通路。该通路可调节肠干细胞的增殖,与肠息肉发生相关。一旦 APC 基因发生突变,则无法降解 β -catenin,过度集聚的 β -catenin 进入细胞核内与 Tcf 转录因子相结合,形成具有转录效应的复合体,激活 β -catenin/Tcf 下游的靶基因转录(C-Myc、cyclin D1、matrilysin、gastrin、ITF-2 等),调节 Wnt 目的基因,使肠干细胞异常增殖分化,细胞基质重构^[8],引起息肉发生。因此,检测 APC 基因有助于癌前病变的及早发现及大肠癌的早期诊断,具有临床意义。

某些大肠腺瘤性息肉患者可无明显临床表现,而全结肠镜检查患者依从性差,易为人们所忽视。粪便检测 DNA 具有取材方便,为非侵入性检查,容易为患者接受。粪便中正常细胞可迅速凋亡,而肿瘤细胞更新快、粘附力差,容易脱落^[9],且脱落的肿瘤细胞不易快速凋亡,甚至可抑制降解酶的作用,保持其稳定性。Boynton 等发现从粪便中提取大肠肿瘤脱落细胞 DNA 片段的分子量较正常肠道黏膜组高,认为粪便中 DAN 可作为检测大肠癌的生物标志物^[10],并且粪便与组织^[6]、粪便与血浆^[11]检测 APC 基因突变的一致性较好。所以,粪便检测 APC 基因突变具有可行性。但粪便中的核酸大多来自细菌和正常肠黏膜细胞,而癌症等病变细胞最多占

1%,本研究发现腺瘤性息肉患者粪便中 APC 基因的突变率为 21.43%,粪便检测腺瘤性息肉 APC 基因突变率不高,可能与标本收集、存储、提取及纯化技术等方面影响有关。本实验所收集的患者检查前粪便,有可能得不到腺瘤组织脱落细胞,其敏感性低于二次自然排便检测法^[12];粪便不能立即交给收集者,室温存储时间长则存在 DNA 降解可能。另外,引物设计仅针对 APC 基因突变的“热点区”(MCR),可能导致其他基因突变点遗漏。如能进一步改进上述不足有可能提高突变率。

中医体质是个体在遗传基础上,在环境的影响下,在生长、发育和衰老的过程中形成的功能、结构和代谢上相对稳定的特殊状态。这种特殊状态往往决定着它的生理反应的特异性及其对某种致病因子的易感性和所产生病变类型的倾向性。随着“后基因组学时代”的到来,“证候—体质—基因组学”的研究模式已成为研究亮点。除意外伤害,疾病的发生大都与基因的突变及异常表达有着直接或间接的关系。具有整体性、动态性的基因组学研究理论与中医理论有着惊人的契合点。关于大肠息肉及腺瘤性息肉的易患体质类型,闫思蒙等^[13]、刘杨等^[14]认为以阳虚体质为主。本研究通过中医体质调查结合 APC 基因突变结果分析,认为粪便中存在 APC 基因突变的腺瘤性息肉患者以阳虚体质为多,但发现二者并不存在相关性($P > 0.05$),可能与所调查的样本量大小有关。依据王琦教授“体质可调论”,如能通过调整阳虚体质,或许能减少腺瘤性息肉的发生,还需进一步研究。

本研究关于粪便中检测散发性腺瘤性息肉相关突变基因处于初步阶段,尚需进一步改进粪便标本收集、保存、提纯等工作,增加样本含量,提高 APC 基因的检出率及突变率。基于粪便基因检测法为无创检测,样本取材方便,患者依从性好等特点,如能充分利用基因芯片技术,联合多基因粪便检测,增加

单个粪便标本收集次数及总的样本含量,采用灵敏度高、特异性好的基因提纯技术,并以中医体质调查为辅助,粪便基因检测方法有望成为癌前病变筛查的常规应用技术。

参考文献

- [1] Tan D, Ross W A. Colorectal polyps: clinical significance of endoscopic and pathologic correlation[J]. Am J Clin Pathol, 2008, 129:659-660.
- [2] 林金容,姜泊,张亚历,等. 散发性结直肠癌组织 APC 突变的研究[J]. 世界华人消化杂志, 1999, 7(9):805-805.
- [3] 王琦. 9 种基本中医体质类型的分类及其诊断表述依据[J]. 北京中医药大学学报, 2005, 28(4):1-1.
- [4] 王吉耀,廖二元,黄丛新,等. 内科学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2013, 5:471-471.
- [5] Traverso G, Shuber A, Levin B, et al. Detection of APC mutations in fecal DNA from patients with colorectal tumors[J]. New Engl J Med, 2002, 346(5):311-320.
- [6] 刘志贞,李佩珍,韩晓立,等. 大肠癌病人粪便和组织中 APC 基因突变的研究[J]. 现代预防医学, 2007, 34(3):446-447.
- [7] Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2008, 8:387-398.
- [8] Vlad A, Rohrs S, Klein-Hitpass L, et al. The first five years of the Wnt targetome[J]. Cell Signal, 2008, 20:795-802.
- [9] Osborn N K, Ahlquist D A. Stool screening for colorectal cancer: molecular approaches[J]. Gastroenterology, 2005, 128:192-206.
- [10] Boynton K A, Summerhayes I C, Ahlquist D A, et al. DNA integrity as a potential marker for stool-based detection of colorectal cancer[J]. Clin Chem, 2003, 49:1058-1065.
- [11] 詹俊,李新,于钟,等. 粪、血 APC 及 K-ras 基因突变联合检测在大肠癌筛查中的作用[J]. 南方医科大学学报, 2007, 27(7):1018-1020.
- [12] 武子涛,李世荣,韩英,等. 几种粪便脱落细胞检查方法的大肠癌筛检效率比较[J]. 中华消化杂志, 2008, 28(6):397-400.
- [13] 闫思蒙,刘杨,麻树人,等. 200 例大肠息肉患者中医体质与证候类型及其关系的研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2014, 20(6), 760-762.
- [14] 刘杨,冯玉霞,闫思蒙,等. 大肠息肉病理类型与中医体质关系的研究[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2014, 22(6):291-293.

外文字母的书写规范

论文中应正确使用外文字母的正斜体、黑白体、大小写和上下角标的表示,易混淆者应予以标明。

外文正体的使用场合:①计量单位和 SI 词头符号。②数字式中的运算符号、指数和对数函数符号、特殊常数符号、缩写符号等。例如:∑(连加),ln(自然对数),lg(常用对数),lim(极限),π(圆周率),max(最大值),min(最小值)等。③生物学中亚族以上(含亚族)的拉丁文学名及定名人。④化学元素符号。⑤仪器、元件、样品等的型号、代号。⑥用作序号和编号的字母,如附录 A,B 组。⑦外文的人名、地名和书名,以及缩略语、首字母缩写词等。

外文字母斜体的常用场合:①所有的量符号和量符号中代表量及变动性数字的下角标符号。②用字母代表的数和一般函数。③统计学符号。④生物学中属以下(含属)的拉丁文学名。⑤化学中表示旋光性、分子构型、构象、取代基位置等的符号。例如:左旋 *l* -, 右旋 *d* -, 外消旋 *dl* -, 邻位 *o* -, 对位 *p* -, 顺式 *Z* -, 反式 *E* - 等。