PIK3CA 基因突变的 MassARRAY 分子量阵列分析 *

梁 平[1] 赵锦荣[1] 惠延平[2] 孙建斌[1] 王 伟[1] 汪 钦[1] 包 晗[1] 刘永兰[1] 金天博[3]
郭晏海[1] 张 菊[1] 颜 真[1△]

(1 第四军医大学药学院药物基因组学教研室 陕西 西安 710032；2 第四军医大学西京医院病理科 陕西 西安 710032；
3 西北大学国家微检测系统工程技术研究中心 陕西 西安 710069)

摘要 目的：利用 MassARRAY 分子量阵列分析系统检测胃癌组织 PIK3CA 基因突变。**方法：**从胃癌石蜡包埋组织中提取基因组，PCR 反应扩增目的基因片段，MassARRAY 分子量阵列分析系统检测 PIK3CA 基因突变；焦磷酸测序验证检测结果。**结果：**中国西部地区 144 例胃癌组织样本中 PIK3CA_E542K(1624G＞A)突变携带率为 77.6%，PIK3CA_E545K(1633G＞A)突变携带率为 84%。MassARRAY 分子量阵列分析系统检测结果与焦磷酸测序结果达到 100%吻合。**结论：**建立了 MassARRAY 分子量阵列分析系统检测基因突变的方法，初步建立了中国西北地区汉族人群胃癌组织 PIK3CA 基因 PIK3CA_E542K(1624G＞A)和 PIK3CA_E545K (1633G＞A)位点突变频数。

关键词：胃癌；基因；基因分型；基因突变
中图分类号：Q75，Q78，R284.2 **文献标识码：**A **文章编号：**1673-6273(2011)10-1877-04

Genotyping of PIK3CA on Gastric Cancer by MassARRAY*

LIANG Ping[1], ZHAO Jin-rong[1], HUI Yan-ping[2], SUN Jian-bin[1], WANG Wei[1], WANG Qin[1], BAO Han[1], LIU Yong-lan[1], JIN Tian-bo[3] GUO Yan-hai[1], ZHANG Ju[1], YAN Zhen[2△]

(2 Xi Jing hospital of Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032, P.R. China;
3 Northwest University, Xi'an, 710069, P.R. China)

ABSTRACT Objective: To investigate the PIK3CA gene mutation by MALDI-TOF mass spectrometry method (MassARRAY). Methods: Genomic DNA was extracted from paraffin embedding gastric cancer tissues. Targeted PIK3CA gene fragments were amplified by PCR. The remaining and nonincorporated dNTPs were removed from amplification products by Shrimp alkaline phosphatase(SAP). Mass spectrometry detection was carried out after primer extension reaction and primer extension reaction cleanup. Results: In 144 paraffin embedding gastric cancer tissues were detected, the mutation ratio of PIK3CA_E542K(1624G＞A) was 77.6%, and the mutation ratio of PIK3CA_E545K (1633G＞A) was 84%. All PIK3CA mutation results were the same as pyrosequencing results. Conclusion: The MAL- DI-TOF mass spectrometry method for PIK3CA mutation detection was successfully established. The mutation frequencies of PIK3CA_E542K (1624G＞A) and PIK3CA_E545K (1633G＞A) of gastric cancer have primarily been set up and this founding is only con- cerning with people of Han nationality among nor-thwest China.

Key words: Gastric cancer; Gene; Genotyping; Gene mutation
Chinese Library Classification (CLC): Q75, Q78, R284.2 Document code: A
Article ID: 1673-6273(2011)10-1877-04

前言

恶性肿瘤是世界范围内危害最为严重的疾病之一，其中胃癌在的发病率与死亡率居我国恶性肿瘤之首。近年来，随着研究的深入，遗传因素与恶性肿瘤的密切程度受到很大关注。众多基因的突变均与肿瘤的发生发展密切相关[1]。

PIK3CA 基因是一种癌基因，具有调控细胞增殖、分化、存活等生理功能，主要在脑、肺、乳腺、胃肠、宫颈、卵巢等组织中表达[2]。研究显示，PIK3CA 基因的突变可促使细胞癌变，与肺癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、卵巢癌及胃癌有着密切的关系[3-14]。然而目前针对该基因的突变研究还不够深入，基因突变与下游信号转导及其调控的关系、与肿瘤发生发展的关系及其机制、与肿瘤发生的预测和治疗相关性等都有待进一步阐明。

本研究利用 MassARRAY 分子量阵列基因分析系统检测胃癌组织中 PIK3CA 基因突变[15-19]，旨在分析中国西北地区汉族人群 PIK3CA 基因突变状况并建立 MassARRAY 分子量阵列基因分析检测方法。

* 基金项目：国家重点基础研究发展规划(973)课题资助(2010CB933900)，陕西省科技攻关项目(2008K09-09)和西安市科技计划项目(SF09027)资助
作者简介：梁平(1985-)，男，助教(在读硕士生)，主要研究方向：药物基因组学，电话：13759951769
E-mail : liangping.0913@yahoo.com.cn
△通讯作者：颜真，E-mail : yanzhen@fmmu.edu.cn
(收稿日期：2011-02-25 接受日期：2011-03-18)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料与方法

1.1 研究对象

第四军医大学第一附属医院 2009 年 -2010 年间 150 例胃癌患者组织标本，其中男 114 例，女 36 例。年龄 33~82 岁，平均年龄 58.2 岁。全部标本均经 4%甲醛液固定、脱水石蜡包埋处理。样本信息通过完整病例及随访资料获得。

1.2 实验材料

石蜡基因组提取试剂盒(OMEGA 公司)；iPlex Gold 试剂盒(SQUENOM 公司)；焦磷酸测序试剂盒(Biotage 公司)；高速离心机(Beckman 公司)；核酸定量仪(Eppendorf 公司)；PCR 扩增仪 (MJ Research 公司)；PSQ96 焦磷酸测序仪 (Biotage 公司)；MassARRAY iPLEX Platform(SQUENOM 公司)。

1.3 研究方法

1.3.1 基因位点选择 从 COSMIC 数据库中选择在胃癌组织样本中发生突变频率较高的，位于人染色体 3q26 的 PIK3CA 基因 (基因 ID5290) 两个突变位点：PIK3CA_E542K(1624G＞A)和 PIK3CA_E545K(1633G＞A)。

1.3.2 引物设计 利用 Assay Designer 引物设计软件设计相应的引物及探针。引物探针设计严格按照 MassARRAY 分子量阵列分析系统的要求设计。设计完成后由华大基因公司合成。

1.3.3 基因组 DNA 提取 胃癌患者基因组 DNA 提取自手术标本石蜡包埋组织切片，采用 E.Z.N.A.TM FFPE DNA Kit 试剂盒提取。提取过程严格按照试剂盒操作说明书进行。待提取过程完成之后，在 384 孔板上将所有样本基因组 DNA 稀释至终浓度 5 ng/μl, 4 ℃保存。

1.3.4 MassARRAY 分子量阵列分析系统检测 (采用 iPlex Gold 配套专用试剂盒)

PCR 反应：分别在 384 孔里加入 1μl 基因组 DNA(5 ng/μl), 4μl PCR 反应混合液 (试剂盒自带) 。反应条件为：94 ℃ 5 min; 94 ℃ 20 sec, 56 ℃ 30 sec, 72 ℃ 1 min, 45 个循环；72 ℃ 3 min。

虾碱性磷酸酶(SAP)反应：在 384 孔中加入 2μl SAP 反应混合液，进行 SAP 反应，反应条件为：37 ℃ 40 min, 85 ℃ 10 min。反应完成后降至室温并 4 ℃保存。

单碱基延伸反应：在 384 孔中加入 2μl 单碱基延伸反应液及适量引物，进行单碱基延伸反应，反应条件为：94 ℃15 min; 94 ℃20 sec, 56 ℃30 sec, 72 ℃1 min, 72 ℃3 min; 4 ℃保存。

点样上机检测：在 384 孔中加入 16 μl 去离子水与 6 mg 树脂，按操作说明书进行脱盐处理；设定仪器运行程序，点样，检测。

1.3.5 焦磷酸测序 将 PIK3CA_E542K 和 PIK3CA_E545K 两位点结合起来设计焦磷酸测序引物，P1 上游引物序列 5'-AAGGGAAAATGACAAAGAACAGC-3'；P2 下游引物序列 5'-GCACTTACCTGTGACTCCATAGAA-3'；测序引物序列 5'-TTCTACACGAGATCCTCTC-3'，正向测序。按照试剂盒及仪器操作说明进行测序。

2 结果

2.1 基因组 DNA 提取与目的基因扩增

采用试剂盒提取石蜡包埋组织基因组 DNA，琼脂糖凝胶电泳及紫外荧光定量检测基因组 DNA 提取的质量及浓度，A 260/A 280 吸光度比值 1.7 至 2.0 者为合格样品。利用设计出的引物对目的基因序列扩增，获得了长度为 104 bp 的目的基因片段，经测序后与 GenBank 数据库资料一致。

2.2 MassARRAY 分子量阵列分析

针对 PIK3CA_E542K (1624G ＞A) 和 PIK3CA_E545K (1633G＞A)两个突变位点，利用 MassARRAY 分子量阵列分析系统对全部 150 例样本进行检测，其中 144 例检测成功，检出率达到 96%。获得了两个位点的突变频数，分别见表 1 和表 2。

2.3 焦磷酸测序

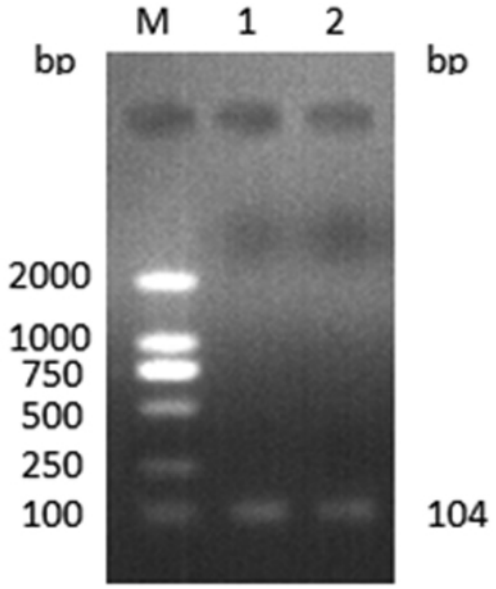

图 1 PIK3CA 基因 PCR 扩增产物琼脂糖电泳图:M: DL2000 分子量标准；1 和 2 泳道：PCR 扩增的 104bpPIK3CA 基因片段

Fig. 1 Results of PCR amplification:M: DL2000 marker; 1, 2: PIK3CA gene fragments

利用焦磷酸测序技术对应检测了上述 144 例样本。将焦磷酸测序结果与 MassARRAY 分子量阵列分析系统检测结果进行比对，两种检测方法符合度达到 100%。

3 讨论

表 1 PIK3CA_1624G＞A 检测结果

Table 1 Gastric tumor samples investigated on PIK3CA_1624G＞A

w/t(G/A)	病例数	百分比
GG	32	22.40%
GA	110	76.90%
AA	1	0.70%

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2 PIK3CA 1633G＞A 检测结果

Table 2 Gastric tumor samples investigated on PIK3CA_1633G＞A

w/t(G/A)	病例数	百分比
GG	23	16.00%
GA	118	81.90%
AA	3	2.10%

在恶性肿瘤中，我国每年新发胃癌病例近 40 万，死亡近 30 万，约占世界同期胃癌死亡人数的 40%。胃癌的发病与种族、生活习惯、职业等有着密切的关系[21]。由于胃癌在我国恶性肿瘤发病率位居前三，在农村死亡率近年来一直列第一，给社会和国家带来沉重的经济负担。因此筛选胃癌相关基因突变的生物标志物，对胃癌的早期诊断和预警具有重要意义。通过建立相关基因的突变检测方法，对多种恶性肿瘤相关基因的突变检测均具有指导意义。目前几乎所有的基因突变检测都是建立于 PCR 基础之上，建立高效的检测基因突变方法，可为临床肿瘤的准确诊断和预警提供更为科学的技术和方法。

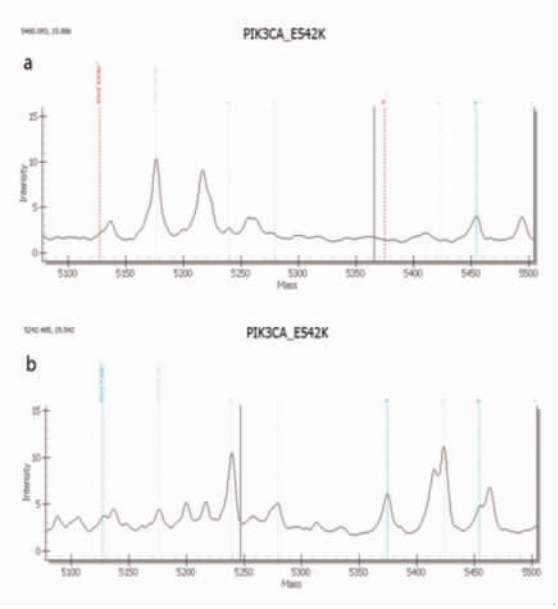

图 2 PIK3CA_E542K 位点 MassARRAY 检测结果:a 野生型；b 突变型

Fig. 2 Results of MassARRAY dection of PIK3CA_E542K:a wild type; b mutant type

MassARRAY 分子量阵列分析系统的基本原理为基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)技术，具有极高的特异性和灵敏度，与芯片技术结合，可以在一个平台上实现 SNP 基因分型、基因表达研究、拷贝数变异、基因甲基化分析、病原体分型和产前诊断的研究或应用。该系统完美地整合了 PCR 技术的高灵敏度和质谱技术的高精确度[20]。其突出特点是能以极高的精确度快速进行基因型识别，直接测出带有 SNP 或其他突变的目标 DNA[10]。MassARRAY 系统反应体系为非杂交依赖性，不存在潜在的杂交错配干扰，不需要各种标记物，其采用的高密度 SpectroCHIP 点阵芯片分析系统能在短时间内完成大量位点的检测并实现全自动分析。该系统顺应了当前医学疾病基因组疾病机制研究迅猛发展的趋势，具有多项优势，包括位点数量及样本选择灵活；检测结果准确，检测准确度高于 99.7%；高通量，理论上一张芯片可以完成 384 个样本的多重 iPLEX GOLD 实验，每个反应孔可以实现多达 36 重反应；性价比高，无需荧光标记，大大降低了反应成本[17]。

本研究利用 MassARRAY 分子量阵列基因分析系统分析了位于人染色体 3q26 的 PIK3CA 基因 PIK3CA_E542K (1624G＞A)和 PIK3CA_E545K(1633G＞A)两个位点。PIK3CA 基因是一种癌基因，编码 I 类磷脂酰肌醇 -3- 激酶(phosphatidylinositol 3-kinases, P I3Ks)的 P110α 催化亚单位。该催化亚单位与 p85 调节亚单位能够组成异源二聚体，即 I 类 P I3Ks, 被生长因子受体酪氨酸激酶所激活并磷酸化下游蛋白质产生磷脂酰肌醇三磷酸，与苏 / 丝氨酸激酶 AKT 结合，激发一系列的信号通路。PIK3CA 基因突变可导致编码蛋白的过度表达，引起 PI3K 的催化活性增强，激活 PI3K/AKT 通路，促使细胞癌变 [2,3,22]。研究发现绝大部分的 PIK3CA 基因突变发生在第 9 和第 20 号外显子，其不仅与肿瘤的发生发展相关，还与肿瘤的分期、分级和预后相关。本研究选择的两个突变位点正是位于第九外显子突变热点区域。经过对 144 例西北地区胃癌患者组织标本的成功检测，获得了这两个位点在胃癌突变频数，通过 MassARRAY 和焦磷酸测序两种方法相互比较检测发现，这两个位点等位基因携带突变的比例显著高于非突变纯合子，提示突变的携带可能与胃癌的发病密切相关。然而其作用机制尚待进一步研究。另外，本研究检出的 PIK3CA 在胃癌组织中的突变率虽然高于其他文献报道，但因为检出病例有限，也需要进一步研究。

本研究建立了基因突变的高通量检测方法，为临床使用 MassARRAY 分子量阵列技术检测胃癌及其他恶性肿瘤相关基因突变提供了新思路。

参 考 文 献(References)

[1] Fock KM, Talley N, Moayyedi P, et al. 胃癌预防亚太地区共识与指南[J]. 胃肠病学, 2008, 13(4); 231-240
Fock K M, Talley N, Moayyedi P, et al. Asia-Pacific Consensus Guidelines on Gastric Cancer Prevention[J]. Chinese Journal Of Gastroenterology, 2008, 13(4); 231-240

[2] 苏娇, 贺小峰, 王苏兰. PIK3CA 基因的生物信息学分析 [J]. 长治医学院学报, 2010, 24(2): 91-94
Su Jiao, He Xiao-feng, Wang Su-lan. The Bioinformatic Analysis of PIK3CA Gene[J]. Journal of Changzhi Medical College, 2010, 24(2): 91-94

[3] 王红洁, 蔡蓉, 卢健. PIK3CA 基因突变与癌症的关系 [J]. 医学分子生物学杂志, 2006, 3(5): 347-349
Wang Hong-jie, Cai Rong, Lu Jian. Relationship of the PIK3CA Gene Mutation and Cancer[J]. Journal of Medical Molecular Biology, 2006, 3(5): 347-349

[4] 杨扬, 高月秋. PIK3CA 突变在人类癌症发生中的作用[J]. 国际遗传

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

学杂志, 2008, 31(2): 111-114
Yang Yang, Gao Yue-qiu. Effect of the PIK3CA Mutation in the Genesis of Human Cancer [J]. International Journal of Genetics, 2008, 31 (2): 111-114

[5] 蒋健坤, 莫维光. 结直肠癌组织中 PIK3CA 基因突变与 AKT1/2 蛋白的表达及其意义[J]. 广西医学, 2010, 1: 24-27
Jiang Jian-kun, Mo Wei-guang. Mutation of PIK3CA Gene and Expression of AKT1/2 in Human Colorectal Cancer and their Biological Significance[J]. Guangxi Medical Journal, 2010, 1: 24-27

[6] 廖绍光, 傅国平, 王雅杰. 上海地区妇女乳腺癌组织 PIK3CA 基因热点突变区域研究 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2009, 16(18): 1365-1367
Liao Shao-guang, Fu Guo-ping, Wang Ya-jie. Mutational hotspots of PIK3CA in breast cancer among Chinese women in Shanghai [J]. Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment, 2009, 16(18): 1365-1367

[7] 李扬扬, 吴淑华, 刘鲁英等. PIK3CA 蛋白在大肠癌变过程中的表达及临床意义[J]. 滨州医学院学报, 2010, 33(1): 5-8
Li Yang-yang, Wu Shu-hua, Liu Lu-ying, et al. Expression and clinical significance of PIK3CA in the progress of colorectal canceration[J]. Journal of Binzhou Medical College, 2010, 33(1): 5-8

[8] 陆兴热, 高仕萍, 刘孝文等. RNA 干扰介导的 PIK3CA 基因沉默抑制 Hep-2 细胞增殖和侵袭力 [J]. 中华检验医学杂志, 2010, 33(3): 83-84
Lu Xing-re, Gao Shi-ping, Liu Xiao-wen, et al. PIK3CA mutation analysis in colon carcinoma [J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2010, 33(3): 83-84

[9] Li V, Wong C, Chan T, et al. Mutations of PIK3CA in gastric adenocarcinoma[J]. BMC Cancer, 2005, 5: 29

[10] Troxell ML, Levine J, Beadling C, et al. High prevalence of PIK3CA /AKT pathway mutations in papillary neoplasms of the breast[J]. Mod Pathol, 2010, 23(1): 27-37

[11] Kostakis GC, Papadogeorgakis N, Koumaki V, et al. Absence of hotspot mutations in exons 9 and 20 of the PIK3CA gene in human oral squamous cell carcinoma in the Greek population [J]. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2010, 109(5): 53-58

[12] Hafner C, Landthaler M, Vogt T, et al. Activation of the PI3K/AKT signalling pathway in non-melanoma skin cancer is not mediated by oncogenic PIK3CA and AKT1 hotspot mutations [J]. Exp Dermatol, 2010, 19(8): 222-227

[13] Saridaki Z, Tzardi M, Papadaki C, et al. Impact of KRAS, BRAF, PIK3CA Mutations, PTEN, AREG, EREG Expression and Skin Rash in ≥ 2nd Line Cetuximab-Based Therapy of Colorectal Cancer Patients[J]. PLoS One, 2011, 6(1): e15980

[14] Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers [J]. Science 2004, 304: 554

[15] Thomas RK, Baker AC, DeBiasi RM, et al. High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer [J]. Nat Genet, 2007, 39(3): 347-351

[16] Fumagalli D, Gavin PG, Taniyama Y, et al. A rapid, sensitive, reproducible and cost-effective method for mutation profiling of colon cancer and metastatic lymph nodes[J]. BMC Cancer, 2010, 10: 101

[17] Rodi CP, Darnhofer Patel, Stanssens B, et al. A strategy for the rapid discovery of disease markers using the MassARRAY system [J]. BioTechniques 2002,32: S62-S69

[18] MacConaill LE, Campbell CD, Kehoe SM, et al. Profiling critical cancer gene mutations in clinical tumor samples [J]. PLoS One, 2009, 4(11): 7887-7893

[19] Ikeda S, Sasazuki S, Natsukawa S, et al. Screening of 214 single nucleotide polymorphisms in 44 candidate cancer susceptibility genes: a case-control study on gastric and colorectal cancers in the Japanese population [J]. Am J Gastroenterol, 2008, 103: 1476-1487

[20] Oeth P , del Mistro G, MarnellosG, et al. Qualitative and quantitative genotyping using single base primer extension coupled with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MassARRAY) [J]. Methods Mol Biol, 2009, 307-343

[21] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2):74-108

[22] Janku F, Tsimberidou AM, Garrido-Laguna I, et al. PIK3CA Mutations in Patients with Advanced Cancers Treated with PI3K/AKT/mTOR Axis Inhibitors[J]. Mol Cancer Ther, 2011, 10(3): 558-565

(上接第 1864 页)

[14] 吴皓，束建清. 半夏姜制对β-谷甾醇和总生物碱含量的影响[J]. 中国中药杂志,1995,20(11):662-664
WU Hao, SU Jian-qing. Effect of Ginger-processing on β-sitosterol and Toltal Alkaloid Contents in Rhizoma Pinelliae [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 1995,20(11):662-664

[15] Young SD, Marshall RS, Hill RP. Hypoxiainduces DNA overreplication and enhances metastatic potential of murine tumor cells[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1988, 85: 9533-9537

[16] Young SD, Hill RP. Effects of reoxygenation on cells from hypoxic regions of solid tumors: Anticancer drug sensitivity and metastatic potential[J]. Journal of the National Cancer Institute, 1990,82:371-380

[17] Cairns RA, Kalliomaki T, Hill RP. Acute (cyclic) hypoxia enhances spontaneous metastasis of KHT murine tumors [J]. Cancer Research, 2001,61: 8903-8908

[18] Postovit LM, Adams MA, Lash GE, et al. Oxygen-mediated regulation of tumor cell invasiveness. Involvement of a nitric oxide signaling pathway[J]. Journal of Biological Chemistry,2002,277:35730-35737

[19] Rofstad EK, Rasmussen H, Galappathi K, et al. Hypoxia promotes lymph node metastasis in human melanoma xenografts by up-regulating the urokinase-type plasminogen activator receptor[J].Cancer Research, 2002, 62, 1847-1853

[20] Siegfried JA, Kennedy KA. The role of membranes in the mechanism of action of the antineoplastic agent adriamycin Spin-labeling studies with chronically hypoxic and drug-resistant tumor cells[J].The Journal of Biological Chemistry, 1983,258:339-343

[21] 张鹏飞. 胃癌中 HIF-la、VEGF 及 Glutl 的表达[J].安徽医科大学学报,2010,45(1):86-89
ZHANG Peng-fei. Expression of HIF-la、VEGF and Glutl in gastric cancer[J].Acta Universitatis Medicinalis Anhui, 2010,45(1):86-89

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net