

# PTEN 在胶质瘤干/祖细胞中变异状态的研究

赵耀东 张全斌 楼美清 黄强

**【摘要】** 目的 为胶质瘤干/祖细胞来自神经干/祖细胞基因突变的推测寻找实验证据,以阐明二者之间的关联性。方法 体外培养的胶质瘤干/祖细胞和神经干/祖细胞,经免疫细胞化学法鉴定后分别进行 RNA 提取、逆转录生成 cDNA,以及针对 *PTEN* 的逆转录-聚合酶链反应;扩增产物进行正反双向测序并与野生型 *PTEN* 基因序列比较肽链序列的异同。结果 神经干/祖细胞 *PTEN* mRNA 序列无变异,胶质瘤干/祖细胞存在大量同义突变和少量异义突变,主要包括第 1 号外显子第 22~42 位碱基突变、第 7 号外显子第 712 位碱基突变和第 9 号外显子第 1192 位碱基突变。致使 *PTEN* 肽链上第 8~14 位氨基酸由原来的“IVSRNKR”突变为“LRLICIF”,第 238 位的“苯丙氨酸(F)”突变为“亮氨酸(L)”,第 398 位的“苏氨酸(T)”突变为“丝氨酸(S)”。其中第 8~14 位和第 238 位氨基酸突变,使 *PTEN* 与细胞膜的结合能力下降,细胞外信号难以转导进入细胞内;第 398 位氨基酸突变则使 *PTEN* 稳定性破坏,易被降解。结论 *PTEN* 基因在胶质瘤恶性转化的早期即已失活,可能是胶质瘤形成的始动因素之一。

**【关键词】** 神经胶质瘤; 肿瘤干细胞; 基因,肿瘤抑制; 突变; 聚合酶链反应

DOI:10.3969/j.issn.1672-6731.2010.06.014

**Research of *PTEN* mutation in glioma stem/progenitor cells** ZHAO Yao-dong, ZHANG Quan-bin, LOU Mei-qing, HUANG Qiang. Department of Neurosurgery, the Tenth People's Hospital of Tongji University, Shanghai 200072, China

Corresponding author: LOU Mei-qing (Email: loumq68128@sina.com)

**【Abstract】 Objective** More and more attention has been given to the presumption that glioma stem cells (GSCs) originate from neural stem cells (NSCs) with gene mutation, however, there is no enough evidence by now. This paper aims to get evidence of this area. **Methods** Glioma stem/progenitor cells (GSPCs) and neural stem/progenitor cells (NSPCs) were cultivated in vitro, and were identified before the following studies. Total RNA was isolated and then reverse-transcribed into cDNA, with primers specific to phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN), high-fidelity Taq polymerase was used for the polymerase chain reaction (PCR) to avoid the incorporation of pseudomutation. After amplification, 10  $\mu$ l of the reaction mixture was electrophoresed through 1.5% agarose gel, and the rest of the reaction mixture was used for sequencing in both directions. The procedures for the isolation of total RNA to PCR and sequencing were repeated twice, and the sequencing results of both DNA and *PTEN* peptide chain were analysed with DNAssist 1.0 software and compared to the sequence of wild-type Homo Sapiens *PTEN* in GenBank. **Results** No mutation happened in the *PTEN* of NSPCs, but there were many base mutations in the mRNA of *PTEN* of GSPCs compared with the wild-type Homo Sapiens *PTEN*. Though most of these mutations were same sense mutation, still several mutations were not, including the normal DNA bases of *PTEN* bases 22 to 42 "ATCGTTAGCAGAAACAAAAGG" in first exon mutated into "CTACGATTGATTTGCATCTTT", base 712 "T" in exon 7 mutated into "C", and base 1192 "A" in exon 9 mutated into "T". Accordingly, for the amino acids (AA) sequence in the peptide chain of *PTEN*, the mutation included AA from the 8th to the 14th (from "IVSRNKR" to "LRLICIF"), the 238th AA (from "F" to "L"), and the 398th AA (from "T" to "S"). These mutated regions were involved in membrane interaction, particularly the combination with phosphatidylinositol 4, 5-biphosphate (PIP<sub>2</sub>) and maintaining the protein stability of *PTEN*. Therefore, these mutations not only lead to the rapid degradation of *PTEN*, but also hinder the cellular function of *PTEN* to down-regulate phosphoinositide 3-kinase (PI<sub>3</sub>K) signaling. **Conclusion** The mutation of *PTEN* occurs even in the early stage of malignant transformation, which is

probably an initiating agent for the tumorigenesis of gliomas.

**【Key words】** Glioma; Neoplastic stem cells; Genes, tumor suppressor; Mutation; Polymerase chain reaction

基金项目:国家自然科学基金资助项目(项目编号:30973081);  
同济大学青年优秀人才培养行动计划(项目编号:2009KJ014)

作者单位:200072 上海,同济大学附属第十人民医院神经外科  
(赵耀东,张全斌,楼美清);苏州大学附属第二医院神经外科(黄强)

通信作者:楼美清(Email:loumq68128@sina.com)

1997 年,McKay<sup>[1]</sup>提出,神经干/祖细胞(NSGCs)具有分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的潜能,且可自我更新并充分提供神经细胞,这一概念很快得到公认。此后,部分从事神经肿瘤学研究的学者提出了“脑肿瘤干细胞(BTSCs)”的概念,这是基于脑肿瘤干细胞不仅在分离、扩增、分化和鉴定等方法学上与神经干/祖细胞基本相同,而且在组织发生学上亦与其存在一定的关联性,并由此推测脑肿瘤干细胞可能是脑肿瘤的起源细胞,而神经干/祖细胞则是脑肿瘤干细胞的起源细胞。因此,黄强<sup>[2]</sup>推测,神经干/祖细胞与脑肿瘤干细胞之间可相互转化,但仍需积累更多的证据。肿瘤组织与发生变异的正常组织一样,其内存在干细胞,称为“肿瘤干细胞(TSCs)”;后者可以大量增殖生成各种子代肿瘤细胞,并构成肿瘤组织,但这些子代细胞自身难以形成新的肿瘤<sup>[3]</sup>。因此,肿瘤干细胞的研究得到广泛关注,而对其生物学特点的研究更是显得至关重要。但就病因学而言,研究者对“肿瘤干细胞是如何生成”的这一问题更感兴趣。在此背景下,我们在神经干/祖细胞延伸至肿瘤干细胞的研究中,通过微阵列比较基因组杂交发现了一些新基因的变化<sup>[4]</sup>,它与胶质瘤干/祖细胞(GSPCs)的发生和神经干/祖细胞基因变异相关。而本研究所报告的 *PTEN* (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) 基因变异即是在此基础上的又一新发现。肿瘤抑制基因 *PTEN* 是一种编码具有磷酸酶活性蛋白质的肿瘤抑制基因,广泛参与细胞的增殖调控、迁移、黏附,以及细胞凋亡等细胞生物学过程<sup>[5]</sup>。但是,*PTEN* 基因在肿瘤的发生和发展过程中易发生变异或丢失,有研究显示,约有 50% 的恶性胶质瘤组织 *PTEN* 基因发生变异<sup>[6]</sup>。而且,*PTEN* 基因在正常胶质瘤干/祖细胞的恶性转化过程中亦可发生丢失或变异<sup>[7]</sup>,我们先前的研究发现,*PTEN* 基因在胶质瘤干/祖细胞中发生丢失<sup>[8]</sup>。但是,在肿瘤干细胞中是否亦存在 *PTEN* 基因的变异? 尚不十分清楚。若存在 *PTEN* 基因变异,属于哪一种变异类型? 这些鲜有报道。为阐明这一问题,我们在原有研究的基础上<sup>[9]</sup>,分别从胶质瘤干/祖细胞和神经干/祖细胞中分离获得总 RNA,逆转录后针对 *PTEN* 基因进行聚合酶链反应(PCR)并正反双向测序,同时与 GenBank 中的野生型 *PTEN* 序列进行对比,以期发现胶质瘤干/祖细胞中 *PTEN* 基因的变异。

## 材料与方法

### 一、材料

1. 细胞来源 (1) 胶质瘤干/祖细胞:取自 1 例在苏州大学附属第二医院神经外科施行手术治疗的 52 岁女性患者的新鲜胶质瘤手术标本,经分离、培养、鉴定及扩增后一直由苏州大学附属第二医院脑肿瘤研究室保存,经体外传代培养超过 3 年,并保持相对稳定的生物学特征<sup>[8-10]</sup>。(2) 神经干/祖细胞:取自 1 例剖宫产 1 年后再次怀孕而行药物(米非司酮)流产的 28 岁患者,为 8 周胎龄的新鲜人胚胎。手术经患者本人及家属充分理解并签署知情同意书,经同济大学附属第十人民医院伦理学委员会批准后,由妇产科医师协助取得。

2. 试剂与仪器 (1) 主要试剂:DMEM/F12 培养基(体积比 1:1)、N2 添加剂(1:100 稀释)以及碱性纤维母细胞生长因子(bFGF,终浓度 20 ng/ml)均为美国 Gibco 公司产品。表皮生长因子(EGF,终浓度 20 ng/ml)由美国 Invitrogen 公司提供。总 RNA 提取试剂盒为宝生物工程(大连)有限公司产品。小鼠抗人巢蛋白(Nes)IgG(1:1000)和异硫氰酸荧光素(FITC)标记的山羊抗小鼠 IgG(1:1000)均购自美国 BD Biosciences 公司,兔抗鼠 CD133 IgG(1:200)及 Cy3 标记的羊抗兔 IgG(1:3000)购自德国 Miltenyi Biotec 公司。(2) 实验仪器:Nikon Eclipse TE2000-U 型倒置相差显微镜购自日本 Nikon 公司。TCS-SP2 型共聚焦显微镜由德国 Leica 公司提供。凝胶成像系统为美国 Bio-Rad 公司 Bio-Rad T2A 型产品。

### 二、实验方法

1. 神经干/祖细胞分离与培养 参考我们以前采用的研究方法<sup>[11]</sup>,取新鲜人胚胎经碘伏浸泡消毒 5 min,无菌条件下剖开囊胚,剔除血管,取出胚胎脑组织,磷酸盐缓冲液反复冲洗后于 DMEM/F12 培养液中漂洗;400 目不锈钢滤网过滤组织块,获得单细胞悬液;置 37 °C、体积分数为 5% 二氧化碳的干细胞培养基(包括含 N2 添加剂的 DMEM/F12 培养液、20 ng/ml 碱性纤维母细胞生长因子和 20 ng/ml 表皮生长因子)中培养。根据培养基颜色,约 5 d 半量换液,10~14 d 传代 1 次,培养 3 个月后用于实验。倒置相差显微镜下观察神经干/祖细胞形态。

2. 免疫细胞化学法鉴定神经干/祖细胞和胶质瘤干/祖细胞 神经干/祖细胞和胶质瘤干/祖细胞分

别培养于经多聚赖氨酸包被的盖玻片 24 孔板中,干细胞培养基继续培养 2 h 使细胞固定于盖玻片表面,弃培养基,经洗涤、固定、封闭、再洗涤后加入 100  $\mu$ l 以封闭液稀释的抗巢蛋白 I 抗和抗 CD133 I 抗,4  $^{\circ}$ C 孵育过夜;磷酸盐缓冲液洗涤 3 次,加入经 FITC 或 Cy3 耦联的 II 抗,室温、避光孵育 2 h;洗涤后以 4'-6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI,0.50  $\mu$ g/ml)孵育 10 min;分别以体积分数为 50%、70%、95% 和 100% 的乙醇梯度脱水,取出盖玻片,覆盖于载玻片上,自然晾干,共聚焦显微镜下观察细胞形态和免疫细胞化学染色结果,拍照。

3. RT-PCR 检测神经干/祖细胞和胶质瘤干/祖细胞 *PTEN* 表达变化 采集生长旺盛的神经干/祖细胞和胶质瘤干/祖细胞,分别离心收集细胞,磷酸盐缓冲液洗涤,TEIzol 法和 UNIQ-10 离心柱法提取总 RNA。取不含核糖核酸酶的 200  $\mu$ l 离心管,加入 5  $\mu$ g 总 RNA、1  $\mu$ l 寡核苷酸序列[Oligo(dT)<sub>12-18</sub>、1  $\mu$ l 10 mmol/L dNTP 和 0.50  $\mu$ l 核糖核酸酶抑制剂(RNase inhibitor)],补充 RNase-free water 至总反应体积达 18.50  $\mu$ l;70  $^{\circ}$ C 水浴 5 min 后迅速冰浴 1 min 使 RNA 解螺旋,分别加入 5  $\mu$ l 5 $\times$  Buffer、0.50  $\mu$ l 核糖核酸酶抑制剂和 1  $\mu$ l (200 U) Moloney 鼠白血病病毒逆转录酶(M-MLV-RT);37  $^{\circ}$ C 水浴孵育 50 min,然后置于 70  $^{\circ}$ C 水浴 15 min 即得第 1 链 cDNA 模板。将上述 cDNA 模板和上、下游引物进行 PCR 扩增,上游引物(P1)序列:5'-CTCCCAGACATGACAGCCAT-3',下游引物(P2)序列:5'-CTGACACAATGTCCTATTGCCA-3';中间引物[第 2 段测序引物(P3)]序列:5'-GGCACTGTTGTTTACACAAGA-3'。PCR 扩增条件:94  $^{\circ}$ C 5 min,94  $^{\circ}$ C 30 s,60  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 90 s;共进行 35 个循环,72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 10  $\mu$ l PCR 扩增产物和 DNA 标准物进行质量分数为 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离,采用 Bio-Rad T2A 型凝胶成像系统观察 *PTEN* 基因表达变化,并拍照。剩余的 PCR 扩增产物用于双向测序。所有实验步骤均重复 2 次,以排除 PCR 扩增过程中出现的基因突变。

## 结 果

### 一、神经干/祖细胞和胶质瘤干/祖细胞鉴定

经数次传代,神经干/祖细胞呈细胞球样悬浮生长,而非神经干/祖细胞则因无血清培养条件而死

亡。其中单细胞和细胞球样细胞均表达巢蛋白,部分细胞 CD133 表达阳性(图 1),提示所获得的细胞为神经干/祖细胞。胶质瘤干/祖细胞在体外干细胞培养基中悬浮呈细胞球样生长,单细胞和细胞球样细胞巢蛋白均表达阳性,部分细胞 CD133 表达阳性(图 2)。

### 二、*PTEN* mRNA 表达变化

1. *PTEN* mRNA 质量鉴定 琼脂糖凝胶电泳检测在约 1200 bp 处可见一 RNA 电泳条带(图 3),提示,胶质瘤干/祖细胞和神经干/祖细胞中均存在 *PTEN* 基因的转录。

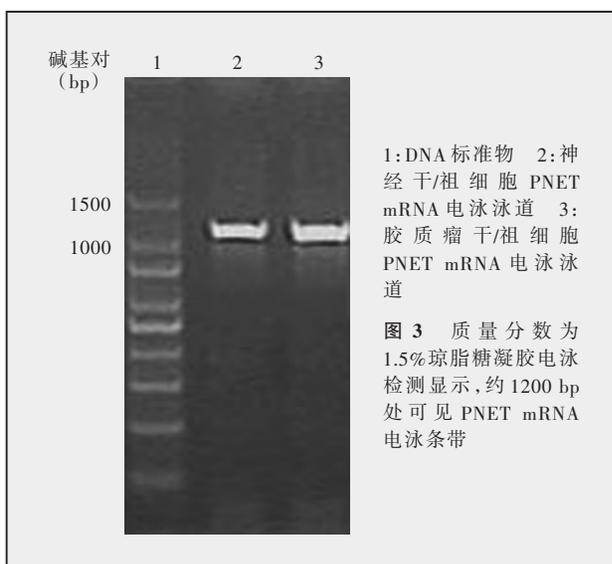
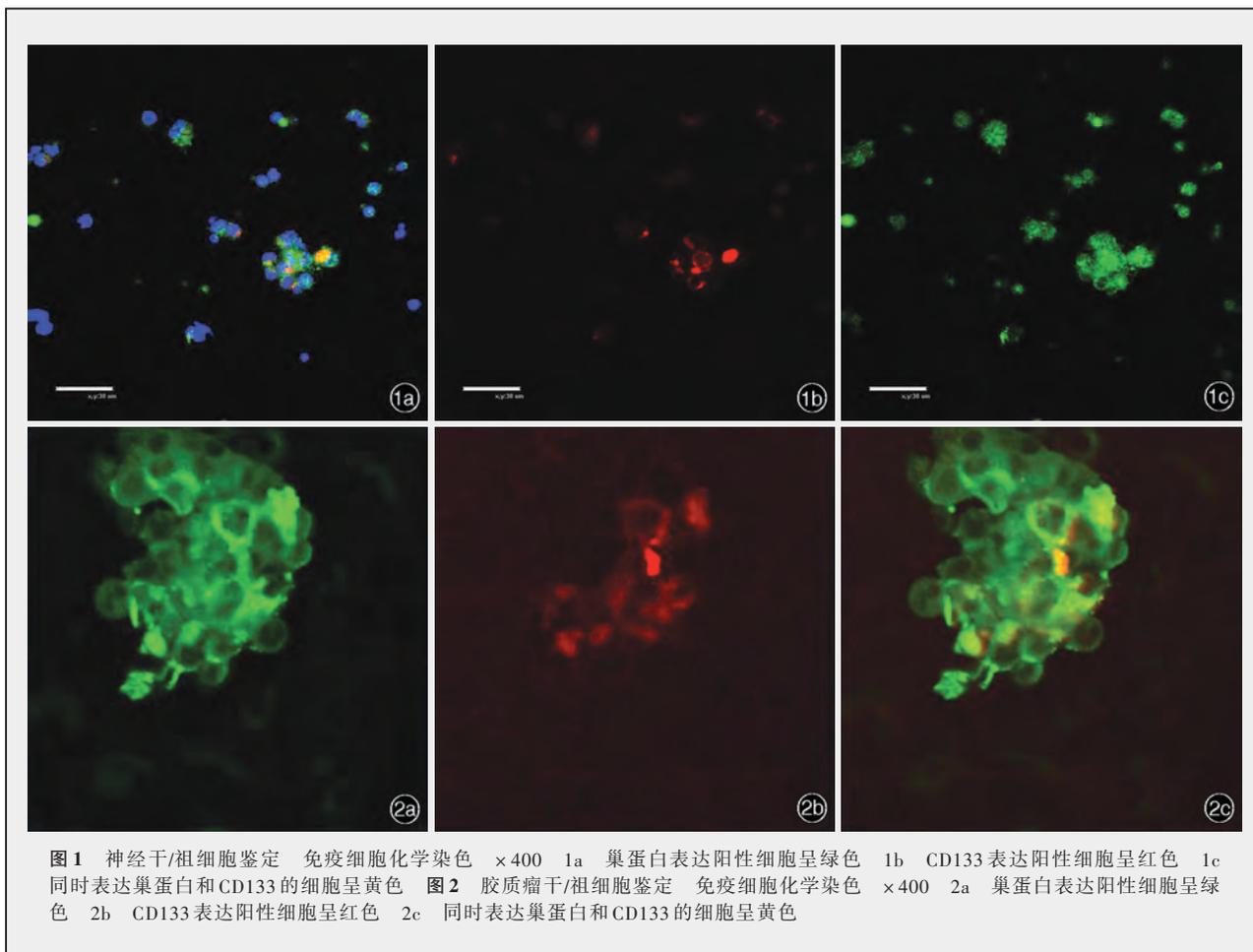
2. *PTEN* mRNA 序列的比较 采用 DNAssist 1.0 计算机软件,将神经干/祖细胞和胶质瘤干/祖细胞 *PTEN* mRNA 序列与 GenBank 中的野生型 *PTEN* CDS 序列(GenBank:NM000314)进行比较,结果显示,神经干/祖细胞 *PTEN* mRNA 与野生型完全一致,而胶质瘤干/祖细胞 *PTEN* mRNA 则存在大量碱基变异(表 1),共计 55 处(75 个)碱基发生变异,多为同义突变,仅少量为异义突变(表 2)。

3. *PTEN* 肽链序列的比较 根据 DNAssist 1.0 计算机软件分析结果,神经干/祖细胞 *PTEN* 肽链与野生型 *PTEN* 肽链完全一致;而胶质瘤干/祖细胞 *PTEN* 肽链存在较显著变异(表 3)。表明:胶质瘤干/祖细胞 *PTEN* 基因变异多为同义突变,仅少量为异义突变。

## 讨 论

脑肿瘤干细胞的分离培养方法源于神经干/祖细胞,其细胞鉴定的标志物与神经干/祖细胞相同。巢蛋白在未分化的神经多能干细胞中表达,一度被认为是脑肿瘤干细胞的重要标志物。然而研究发现,同一群肿瘤细胞,巢蛋白表达阳性的比例远高于 CD133 表达阳性的比例,提示巢蛋白在刚开始分化的祖细胞中也有表达,并非可靠的脑肿瘤干细胞标志物。CD133 最初被人们所认识是作为造血干细胞(HSCs)标志物,而今已是公认的神经干/祖细胞标志物,以及脑肿瘤干细胞最重要的标志物<sup>[12]</sup>。因此,在本研究中,我们对巢蛋白和 CD133 均进行了鉴定,结果表明,所有经体外培养的细胞巢蛋白均表达阳性,部分细胞 CD133 表达阳性,符合神经干/祖细胞和胶质瘤干/祖细胞的标准。

*PTEN* 为一脂质磷酸酶,可将其底物 3,4,5-三



磷酸磷脂酰肌醇( $PIP_3$ )转化为4,5-二磷酸磷脂酰肌醇( $PIP_2$ ),进而对磷脂酰肌醇3-激酶( $PI_3K$ )-AKT信号转导通路发挥负调控作用<sup>[13]</sup>。这一信号转导通路涉及多种下游事件,包括抑制凋亡、经mTOR通路刺激蛋白质合成等<sup>[6]</sup>。PTEN蛋白质分子可以分为

4个部分,包括1个结合域和3个主要的结构域。其中,第6~15位氨基酸残基构成 $PIP_2$ 结合域<sup>[14]</sup>;第15~186位氨基酸残基构成磷酸酶催化域;第186~351位氨基酸残基构成C2域,主要与磷脂膜发生作用<sup>[15]</sup>;第352~403位构成羧基末端(C末端)尾巴,C末端尾巴通过与C2结构域形成分子间作用,保护PTEN免于被快速降解,以维持其稳定性<sup>[16,17]</sup>。本项研究结果显示,胶质瘤干/祖细胞PTEN发生变异,其中第1号外显子变异(与Pubmed No. AK313581报道的1例完全一致)和位于C2结构域内的第238位氨基酸残基变异,均使得PTEN与磷脂膜的结合能力下降,无法催化底物 $PIP_3$ 转化成 $PIP_2$ ,从而失去作用。另外,PTEN基因第398位氨基酸残基位于C末端尾巴上,该位点发生变异还可影响PTEN的稳定性,使其易于被降解。

通过本研究,我们证实了胶质瘤干/祖细胞存在PTEN基因变异,提示在胶质瘤的恶性转化早期即有PTEN基因的失活。由于,PTEN基因广泛参与细胞的增殖调控、迁移、黏附,以及凋亡等细胞生物学

表 1 胶质瘤干/祖细胞 PTEN CDS 序列与野生型 PTEN CDS 序列的比较

序列	位点	基因片段
0	1	ATGACAGCCATCATCAAAGAGAT_CGTTAGCAGAAA <b>CAAAGG</b> AGATATCAAGAGGATGGATTGCGACTTAGACTTGACCTATATTTATCCAAA <b>C</b> ATTATTG
1	1	ATGACAGCCATCATCAAAGAG <b>CTACCAITG_ATTTGCATCTTT</b> AGATATCAAGAGGATGGATTGCGACTTAGACTTGACCTATATTTATCCAAA <b>ATT</b> TATTG
0	101	CTATGGGATTTCCTGCAGAAAGACTTGAAGG <b>C</b> TATACAGGAACAATATT GATGATGTAAGGTTTGGATTCAAAGCATAAAAA <b>ACC</b> ATTACAAGAT
1	101	CTATGGGATTTCCTGCAGAAAGACTTGAAGG <b>T</b> GTATACAGGAACAATATT GATGATGTAAGGTTTGGATTCAAAGCATAAAAA <b>ACC</b> ATTACAAGAT
0	201	ATACAATCT <b>TT</b> TGTGCTGAAAACATTATGACACCGCCAAATTAATTGCA GAGTTGCACA <b>A</b> TATCCTTTTGAAGCATA <b>ACC</b> ACCACAGCTAGA <b>ACT</b> T
1	201	ATACAATCT <b>A</b> TGTGCTGAGAGACATTATGACACCGCCAAATTA <b>ACT</b> GCA GAGTTGCACA <b>G</b> TATCCTTTTGAAGCATA <b>ACC</b> ACCACAGCTAGA <b>ACT</b> T
0	301	ATCAAACCC <b>TTT</b> TGTAAGATCTTGACCAATGGCTAAGTGAAG <b>A</b> TGACAA TCATGTTGCAGCAAT <b>C</b> ACTGTAAAGCTGG <b>AAA</b> GGGAC <b>G</b> ACTGGTGTAA
1	301	ATCAAACCC <b>TTT</b> TGTAAGATCTTGACCAATGGCTAAGTGAAG <b>A</b> CGACAA TCATGTTGCAGCAAT <b>C</b> ACTGTAAAGCTGG <b>AAA</b> AGGAC <b>G</b> ACTGGTGTAA
0	401	TGAT <b>A</b> TGTGCATATTT <b>A</b> TACATCGGGCAA <b>A</b> TTTTTAAAGGCACAAGAG G <b>CC</b> CT <b>A</b> GATTT <b>C</b> TATGGGAA <b>G</b> TAAGGACCAGAG <b>A</b> CAAAAAGGAGTA <b>A</b> C
1	401	TGAT <b>TT</b> TGTGCATATTT <b>T</b> GCATCGGGCAA <b>G</b> TTTTTAAAGGCACAAGAG G <b>CC</b> CT <b>G</b> GATTT <b>T</b> TATGGGAA <b>G</b> TAAGGACCAGAG <b>A</b> TAAAAAGGAGTA <b>A</b> C
0	501	TATCCCGAGTCAGAGCGCTATG <b>T</b> GATTTATAGCTACCTGTTAAAGA AT <b>C</b> TCTGGATTA <b>T</b> AGACCAGTGGCACTGTGTTCCACAAGATGATGTTT
1	501	TATCCCGAGTCAGAGCGCTATG <b>A</b> TATTATTAGCTACCTGTTAAAGA AT <b>C</b> A <b>C</b> TCTGGATTA <b>C</b> AGACCAGTGGCACTGTGTTCCACAAGATGATGTTT
0	601	GAAACTATTCCAATGTCAGTGGCGAACTTGAATCCTCAGTTTGTGGT CTGCCAGCTAAAGGTGAAGAT <b>A</b> T <b>T</b> CTCCAA <b>T</b> CAGGACCCAC <b>AG</b> CA <b>C</b>
1	601	GAAACTATTCCAATGTCAGTGGCGAACTTGAAT <b>CC</b> CAGTTTGTGGT CTGCCAGCTAAAGGTGAAGAT <b>C</b> T <b>A</b> CTCTCCAA <b>C</b> T <b>C</b> AGGACCCAC <b>G</b> CG <b>G</b> C
0	701	GG <b>A</b> AGACA <b>A</b> CTTCATGTA <b>CT</b> TTGAGTTCCTCAG <b>CC</b> GT <b>A</b> CTCTGTGTG GGT <b>A</b> TATCAAAGTAGACTTCTCCACAAACAGAA <b>A</b> AGATGCT <b>A</b> AAAA
1	701	GG <b>G</b> AGACA <b>A</b> AG <b>C</b> TCATGTA <b>CT</b> TTGAGTTCCTCAG <b>CC</b> AT <b>G</b> CTCTGTGTG GGT <b>A</b> CATCAAAGTAGACTTCTCCACAAACAGAA <b>A</b> AGATGCT <b>C</b> AAAA
0	801	GGACAAAATGTTTCACTTTTGGTAAATAC <b>A</b> TTCTTCATACCAGGACCAG AGGAAACCTCAGAAAAAG <b>T</b> CAAAAATGGAAGCT <b>A</b> TGTGATCA <b>A</b> GAAATC
1	801	GGACAAAATGTTTCACTTTTGGTAAATAC <b>G</b> TTCTTCATACCAGGACCAG AGGAAACCTCAGAAAAAG <b>T</b> CAAAAATGGAAGCT <b>TT</b> TGTGATCA <b>G</b> GAAATC
0	901	GATAGCATT <b>G</b> CAGTATAGCGCT <b>C</b> AGATAATGACAAG <b>A</b> ATATCT <b>A</b> CT <b>A</b> CTT <b>A</b> ACAAAAATGATCTTGACAAAAGCAA <b>A</b> TAAAGACAA <b>AG</b> CC <b>A</b>
1	901	GATAGCATT <b>T</b> GATATAGCGCT <b>G</b> CGATAATGACAAG <b>A</b> GTATCT <b>T</b> C <b>T</b> C <b>A</b> CC <b>T</b> GACAAAAATGATCTTGACAAAAGCAA <b>A</b> CAAGACAA <b>AG</b> CC <b>A</b>
0	1001	ACCGATACT <b>TT</b> CTCCAAATTTAAGGTGA <b>A</b> GGT <b>G</b> CTACTTCACAAAACA GTAGAG <b>A</b> CC <b>G</b> TCAAATCCAGAGGCTAGCAGTCAACTTCTG <b>T</b> A <b>A</b> CA <b>C</b> C
1	1001	ACCGATACT <b>CT</b> CTCCAAATTTAAGGTGA <b>A</b> TT <b>A</b> TACTTTACAAAACA GTAGAG <b>A</b> CC <b>A</b> CTCAAATCCAGAGGCTAGCAGTCAACTTCTG <b>T</b> C <b>A</b> CT <b>C</b>
0	1101	AGAT <b>G</b> TTAGTGACAATGAACCTGATCATTATAGATATTCTGACACCAGT ACTCTGATCCAGAGAATGAACCTTTTGTGAAGATCAGCAT <b>A</b> CA <b>A</b> AA <b>T</b> T
1	1101	AG <b>C</b> GTTAGTGACAATGAACCTGATCATTATAGATATTCTGACACCAGT ACTCTGATCCAGAGAATGAACCTTTTGTGAAGATCAGCAT <b>T</b> CA <b>A</b> AA <b>T</b> T
0	1201	ACAAAAGTCTGA
1	1201	ACAAAAGTCTGA

注:序列0,野生型PTEN CDS序列;序列1,胶质瘤干/祖细胞PTEN CDS序列;红色位点为基因突变位点

表 2 胶质瘤干/祖细胞 PTEN 基因发生突变的 mRNA 和氨基酸残基

变异碱基	外显子	正常碱基序列	胶质瘤干/祖细胞碱基序列	密码子	正常氨基酸残基序列	胶质瘤干/祖细胞氨基酸残基序列
22~42	1	ATCGTTAGCAGAAACAAAAGG	CTACGATTGATTTGCATCTTT	8~14	IVSRNKR	LRLICIF
712	7	T	C	238	F	L
1192	9	A	T	398	T*	S

注:T,胸腺嘧啶;C,胞嘧啶;A,腺嘌呤;F,苯丙氨酸;L,亮氨酸;T\*,苏氨酸;S,丝氨酸

表 3 胶质瘤干/祖细胞中 PTEN 肽链序列与野生型 PTEN 肽链序列的比较

序列	位点	肽链
0	1	MTAIKE <b>IVSRNKR</b> RYQEDGFDDLTYIYPNIAMGFPAERLEGVYRNNIDVVRFLDSKHKHNYKIYNLCAERHYDTAKFNCRVAQYPF
1	1	MTAIKE <b>LRLICIF</b> RYQEDGFDDLTYIYPNIAMGFPAERLEGVYRNNIDVVRFLDSKHKHNYKIYNLCAERHYDTAKFNCRVAQYPF
0	91	EDHNPPQLELIKPFCELDQWLSEDDNHVA <b>A</b> IHCKAGKGR <b>T</b> GMICAYLLHRGKFLKAQEALDFYGEVTRDKKGVTPISQRRYVYSSY
1	91	EDHNPPQLELIKPFCELDQWLSEDDNHVA <b>A</b> IHCKAGKGR <b>T</b> GMICAYLLHRGKFLKAQEALDFYGEVTRDKKGVTPISQRRYVYSSY
0	181	LLKNHLDYRPVALLFHKMMFETIPMFSGGTCNPQFVVCQLK <b>V</b> KIYSSNSG <b>P</b> TRREDK <b>F</b> MYFEFPQPLVCGDIKVEFFHKQNKMLKDKDM
1	181	LLKNHLDYRPVALLFHKMMFETIPMFSGGTCNPQFVVCQLK <b>V</b> KIYSSNSG <b>P</b> TRREDK <b>L</b> MYFEFPQPLVCGDIKVEFFHKQNKMLKDKDM
0	271	FHFVVNTFFIPGPEETSEKVENGLCDQEIDSICSIERADNDKEYLVLT <b>L</b> TKNLDKANKDKANRYFSPNFKVLYFTKTVEEPSNEAS
1	271	FHFVVNTFFIPGPEETSEKVENGLCDQEIDSICSIERADNDKEYLVLT <b>L</b> TKNLDKANKDKANRYFSPNFKVLYFTKTVEEPSNEAS
0	361	SSTSVPDVSNDNEPDHYRSDTTSDPENEPFDED <b>Q</b> H <b>T</b> QITKV
1	361	SSTSVPDVSNDNEPDHYRSDTTSDPENEPFDED <b>Q</b> H <b>S</b> QITKV

注:序列0,野生型PTEN肽链序列;序列1,胶质瘤干/祖细胞PTEN肽链序列;红色位点为基因突变位点

过程<sup>[5]</sup>,因此,我们推测 *PTEN* 基因失活可能是胶质瘤形成的始动因素之一。

### 参 考 文 献

- [1] McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science*, 1997, 276:66-71.
- [2] 黄强. 胶质瘤起源细胞探讨. 中国微侵袭神经外科杂志, 2003, 8:337-340.
- [3] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 2001, 414:105-111.
- [4] 黄强. 神经干细胞延伸至脑肿瘤干细胞的研究. 中国现代神经疾病杂志, 2007, 7:407-412.
- [5] Marino S, Krimpenfort P, Leung C, et al. *PTEN* is essential for cell migration but not for fate determination and tumorigenesis in the cerebellum. *Development*, 2002, 129:3513-3522.
- [6] Shintani T, Klionky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, 2004, 306:990-995.
- [7] Yilmaz OH, Valdez R, Theisen BK, et al. *Pten* dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature*, 2006, 441:475-482.
- [8] Huang Q, Zhang QB, Dong J, et al. Glioma stem cells are more aggressive in recurrent tumors with malignant progression than in the primary tumor, and both can be maintained long-term in vitro. *BMC Cancer*, 2008, 8:304.
- [9] Zhang QB, Ji XY, Huang Q, et al. Differentiation profile of brain tumor stem cells: a comparative study with neural stem cells. *Cell Res*, 2006, 16:909-915.
- [10] Zhao YD, Huang Q, Yang J, et al. Autophagy impairment inhibits differentiation of glioma stem/progenitor cells. *Brain Res*, 2010, 1313:250-258.
- [11] 王飞, 黄强, 王爱东, 等. 人小龄胚胎神经干细胞的分离培养、扩增及鉴定. 中国微侵袭神经外科杂志, 2003, 8:173-175.
- [12] 张全斌, 黄强, 兰青. 脑肿瘤干细胞的热点问题及研究进展. 中华医学杂志, 2005, 85:1868-1870.
- [13] Maehama T, Dixon JE. The tumor suppressor, *PTEN/MMAC1*, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate. *J Biol Chem*, 1998, 273:13375-13378.
- [14] Campbell RB, Liu F, Ross AH. Allosteric activation of *PTEN* phosphatase by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Biol Chem*, 2003, 278:33617-33620.
- [15] Lee JO, Yang H, Georgescu MM, et al. Crystal structure of the *PTEN* tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association. *Cell*, 1999, 99:323-334.
- [16] Wang X, Shi Y, Wang J, et al. The crucial role of the C-terminus of *PTEN* in antagonizing *NEDD4-1*-mediated *PTEN* ubiquitination and degradation. *Biochem J*, 2008, 414:221-229.
- [17] Odrozola L, Singh G, Hoang T, et al. Regulation of *PTEN* activity by its carboxyl-terminal autoinhibitory domain. *J Biol Chem*, 2007, 282:23306-23315.

(收稿日期:2010-09-19)

## 第八届亚洲神经肿瘤学术大会、第五届韩-中神经肿瘤会议暨中国抗癌协会神经肿瘤专业委员会第八届学术会议征文通知

由亚洲神经肿瘤协会(Asian Society for Neuro-Oncology, ASNO)和中国抗癌协会神经肿瘤专业委员会主办,苏州大学附属第一医院承办的第八届亚洲神经肿瘤学术大会(8th ASNO Meeting)、第五届韩-中神经肿瘤会议(5th Korean-Chinese Neuro-Oncology Meeting)暨中国抗癌协会神经肿瘤专业委员会第八届学术会议拟定于2011年5月26-29日在江苏省苏州市举行。届时将邀请国际神经肿瘤著名专家作专题报告,并安排大会论文报告和壁报交流。内容包括神经肿瘤外科、神经肿瘤病理、神经肿瘤放射治疗、神经肿瘤影像学、神经肿瘤药物化疗和生物治疗等与神经肿瘤相关学科的基础与临床研究。欢迎神经肿瘤学专业人士踊跃投稿和参会。

1. 征文要求 尚未在国内外公开发表的论文全文,并提交800字以内的英文摘要(亚洲神经肿瘤协会会议和韩-中神经肿瘤会议)或中文摘要(中国神经肿瘤会议)。大会同时设立青年(40岁以下)优秀论文奖,请提供中文论文全文。

2. 投稿方式 请网上投稿:www.asno2011.cn和www.csno.cn。参加评奖的论文需同时将论文全文发送至中国抗癌协会神经肿瘤专业委员会秘书处(Email:secretary@csno.cn)。

3. 截稿日期 2010年12月31日。

4. 联系方式 大会会务处设在:苏州大学附属第一医院神经外科(江苏省苏州市十梓街188号)。邮政编码:215006。电话/传真:(0521)67781170。Email:asno2011@asno2011.org。详细信息请登录:www.asno2011.cn和www.csno.cn。

## 第十届(2011年)北京协和医院TCD学习班通知

由北京协和医院神经科主办、北京协医科技交流中心协办的第十届(2011年)北京协和医院TCD学习班拟定2011年4月22-26日在北京举办,欢迎神经内科医师和从事本专业的技术人员参加。学业结束时将授予国家级继续医学教育学分10分(项目编号尚在备案中)。项目负责人:高山教授。讲课内容在去年的基础上有所更新,增加台湾神经超声学研究现状和脑静脉系统的TCD诊断。对上述学习内容有兴趣的同道欢迎登录“叩诊锤”论坛,以进一步了解项目备案的进展情况(备案项目会在2011年2月初得到确切消息,一旦确定会很快在论坛上发布正式通知)。“叩诊锤”论坛网址: http://www.rhammer.cn/forum。