

• 临床检验研究论著 •

某地区结直肠癌患者 KRAS 基因及 BRAF 基因突变状态的检测分析

许惠利¹, 严俊¹, 李静², 陈跃宇³, 江莺¹, 吴跃龙²

(上海市嘉定区中心医院:1. 血液肿瘤科;2. 病理科;3. 普外科 201800)

摘要:目的 检测某地区结直肠癌患者 KRAS 基因和 BRAF 基因的突变状态及其与年龄、性别的关系。方法 由某地区 30 例结直肠癌患者石蜡组织中提取 DNA,通过直接测序法及荧光定量 PCR 法检测 KRAS 基因及 BRAF 基因突变状态。结果 KRAS 基因突变率为 43.3%,共发现 6 种突变类型,主要位于 12、13 密码子,其中以 c. 38G>A 突变率最高(38.5%)。单因素及多因素分析均提示 KRAS 突变与年龄或性别无相关性。BRAF 基因突变率为 0。结论 某地区结直肠癌患者 KRAS 基因突变率高,靶向治疗前进行突变状态检测具有重要临床价值。

关键词:结直肠肿瘤; KRAS 基因; BRAF 基因; 基因突变

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.13.024 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2012)13-1595-02

Mutation of KRAS and BRAF gene in patients with colorectal cancer in certain area

Xu Huili¹, Yan Jun¹, Li Jing², Chen Yueyu³, Jiang Ying¹, Wu Yuelong²

(1. Department of Hematology and Oncology; 2. Department of Pathology; 3. Department of General Surgery; Shanghai Jiading District Central Hospital, Shanghai 201800, China)

Abstract: Objective To investigate the prevalence of KRAS and BRAF gene mutation in patients with colorectal cancer in certain area and its relationship with age and sex. **Methods** DNA, extracted from paraffin tissue samples of 30 patients with colorectal cancer, were examined by direct sequencing for KRAS gene and fluorescence quantitative polymerase chain reaction for BRAF gene.

Results 43.4% patients were found carrying KRAS mutations of 6 types, mainly located on codon 12 and 13. The most common mutation type was 38G>A(38.5%). KRAS mutation was not associated with age or sex. No BRAF mutation was found. **Conclusion**

KRAS mutation rate might be high in patients with colorectal cancer in this area. Examination of KRAS mutation before targeted therapy could be valuable in clinic work.

Key words:colorectal neoplasms; KRAS gene; BRAF gene; gene mutation

基因突变是肿瘤发生的重要因素之一。结直肠癌作为最常见的消化道恶性肿瘤之一,目前已知与多种基因突变有关。近年来 KRAS 基因和 BRAF 基因突变在结直肠癌发病中的作用引起了较多关注。本研究以某地区结直肠癌患者为研究对象,抽样研究该地区患者两基因的突变状态。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集上海市嘉定区结直肠癌患者蜡样标本 30 例,男性 17 例,女性 13 例;年龄 39~86 岁,平均(70.97±11.38)岁。

1.2 方法 从石蜡组织中提取 DNA。采用荧光定量 PCR 法检测 BRAF 基因,PCR 直接测序法检测 KRAS 基因。检测均由上海美众医学检验所(复旦大学新培晶临床分子研究中心)完成。

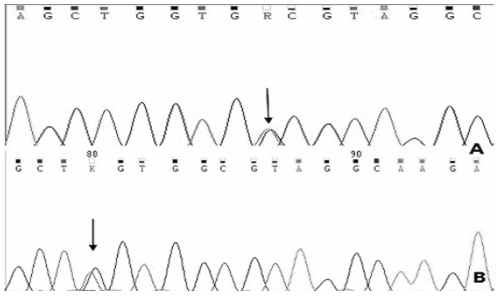
1.3 统计学处理 采用卡方检验单因素分析以及 Logistic 回归多因素分析基因突变与年龄、性别的相关性, $P>0.05$ 认为差异有统计学意义。采用 PASW18.0 软件进行统计。

2 结果

2.1 30 例结直肠癌患者中共发现 KRAS 基因突变 13 例(43.3%),见图 1,共发现 6 种突变类型,主要位于 12、13 密码子,12 密码子突变 7 例,13 密码子突变 6 例,其中以 c. 38G>A 突变比例最高(38.5%),见表 1。

2.2 单因素卡方检验及多因素 Logistic 回归分析均提示 KRAS 突变与性别或年龄不相关($P>0.05$),见表 2、3。

2.3 所有患者均未检测出 BRAF 基因突变。



A: c. 38G>A; B: c. 34C>T。

图 1 基因测序检测 KRAS 基因突变

表 1 KRAS 基因突变类型

组别	密码子	n	突变率(%)
c. 37G>C	13	1	7.7
c. 34G>A	12	1	7.7
c. 38G>A	13	5	38.5
c. 34G>T	12	2	15.4
c. 35G>A	12	2	15.4
c. 35G>T	12	2	15.4

表 2 Logistic 回归分析 KRAS 突变与年龄、性别的关系

组别	系数值	标准误	Wald 卡方值	自由度	P 值	OR 值
性别	-0.205	0.746	0.076	1	0.783	0.815
年龄	-0.001	0.033	0.001	1	0.969	0.999

表 3 卡方检验分析 KRAS 突变与年龄、性别的关系					
组别	KRAS(n)			卡方值	P 值
		野生型	突变型		
性别	男	10	7	0.074	0.785
	女	7	6	—	—
年龄	≤60 岁	2	2	0	1.000
	>60 岁	15	11	—	—

—:无数据。

3 讨 论

RAS-RAF-MEK-ERK-MAPK 通路 与 肿 瘤 发 生、发 展 密 切 相 关。突 变 的 RAS 基 因 可 以 持 续 激 活 RAF-MEK-ERK-MAPK 信 号 传 导 通 路。KRAS 基 因 及 BRAF 基 因 是 该 通 路 的 重 要 相 关 基 因，作 为 抑 癌 基 因，其 突 变 可 导 致 细 胞 的 异 常 增 殖 及 永 生 化^[1]。

KRAS 基 因 位 于 12p12.1，编 码 位 于 细 胞 膜 内 侧 的 具 有 GTP 活 血 的 鸟 嘌呤 核 苷 酸 结 合 蛋 白，是 表 皮 生 长 因 子 受 体 (EGFR) 的 下 游 分 子，主 要 在 膜 受 体 腺 苷 环 化 酶 信 号 转 导 途 径 中 发 挥 作 用^[2]。在 结 直 肠 癌 的 靶 向 治 疗 中，EGFR 抑 制 剂 及 抗 EGFR 单 抗 能 特 异 性 抑 制 野 生 型 KRAS 基 因 的 结 直 肠 癌 细 胞 生 长。而 KRAS 突 变 型 结 直 肠 癌 患 者 未 能 获 益，可 能 是 因 为 KRAS 基 因 突 变 后 可 导 致 KRAS 蛋 白 不 依 赖 上 游 信 号 而 永 久 激 活，导 致 细 胞 持 续 生 长 及 扩 散^[3]。因 此，结 直 肠 癌 KRAS 基 因 的 突 变 状 态 是 决 定 靶 向 治 疗 疗 效 的 关 键 指 标^[4]。

KRAS 基 因 在 结 直 肠 癌 中 发 生 突 变 的 概 率 高 于 其 他 RAS 基 因^[5]，其 在 结 直 肠 癌 中 的 突 变 率 在 欧 美 国 家 报 道 约 为 30%~68%，国 人 约 为 15%~35%^[5-6]。本 研 究 提 示 某 地 区 KRAS 突 变 率 为 43.3%，略 高 于 中 国 平 均 水 平，但 本 研 究 样 本 量 较 小，可 能 存 在 抽 样 误 差，进 一 步 大 样 本 研 究 有 助 于 减 少 误 差。本 研 究 发 现 KRAS 突 变 以 12、13 密 码 子 突 变 为 主，特 别 以 c.38G>A 突 变 率 最 高 (38.5%)，本 研 究 未 发 现 61 密 码 子 突 变，提 示 国 人 结 直 肠 癌 患 者 存 在 较 大 比 例 的 KRAS 基 因 突 变。由 于 突 变 型 KRAS 基 因 患 者 不 能 从 针 对 EGFR 的 靶 向 治 疗 中 获 益，因 此，中 国 结 直 肠 癌 患 者 靶 向 治 疗 前 常 规 检 测 KRAS 基 因 具 有 重 要 意 义。本 研 究 未 发 现 KRAS 基 因 突 变 与 患 者 性 别 及 年 龄 存 在 相 关 性，与 既 往 一 些 研 究 结 果 一 致^[7]。但 也 有 研 究 发 现 KRAS 突 变 与 年 龄 及 性 别 存 在 相 关 性^[8]，进 一 步 多 中 心、大 样 本 研 究 有 助 于 明 确 其 相 关 性。

BRAF 基 因 属 于 RAF 家 族，位 于 7q34，长 度 为 190 kb，转 录 mRNA 长 度 为 2.5 kb，编 码 蛋 白 包 含 783 个 氨 基 酸^[9]。BRAF 是 MEK/ERK 最 重 要 的 激 活 因 子 之 一，通 过 促 进 细 胞 增 殖 和 侵 袭，改 变 整 合 素 表 达，增 加 基 质 金 属 蛋 白 酶 分 泌 等 影 响 肿 瘤 进 展^[10-11]。多 种 恶 性 肿 瘤 被 发 现 存 在 不 同 比 例 的 BRAF 突 变，包 括 黑 色 素 瘤、肺 癌、结 肠 癌、甲 状 腺 癌 等。结 直 肠 癌 中，BRAF 基 因 突 变 与 KRAS 突 变 呈 负 相 关，且 同 一 肿 瘤 组 织 中 独 立 于 KRAS 突 变，并 于 结 直 肠 癌 分 期 显 著 相 关^[12]。本 研 究 发 现 KRAS 基 因 突 变 比 例 较 高，而 BRAF 基 因 突 变 率 为 0，可 能 与 此 相 关。类 似 结 果 也 出 现 在 肺 癌、前 列 腺 癌 及 卵

巢 癌 中，因 此 普 遍 认 为 BRAF 和 KRAS 突 变 相 互 独 立 地 影 响 肿 瘤 进 程，但 BRAF 基 因 突 变 与 KRAS 突 变 的 相 关 性 及 促 进 肿 瘤 发 生 的 作 用 仍 有 争 议^[13]。

本 研 究 采 取 直 接 基 因 测 序 法 检 测 KRAS 基 因 型，该 技 术 检 测 结 果 准 确 性 及 特 异 性 高，是 基 因 检 测 的 金 标 准。但 该 方 法 对 检 测 技 术 要 求 较 高，易 污 染，结 果 判 读 比 较 耗 时、费 力，成 本 较 高，很 多 基 层 医 院 无 检 测 条 件，因 此 具 有 一 定 局 限 性。荧 光 定 量 PCR 技 术 操 作 简 单，灵 敏 性、特 异 性 高，重 复 性 好，并 且 与 直 接 测 序 法 一 致 率 高，因 此 具 有 较 高 临 床 实 用 价 值。综 上 所 述，上 海 市 嘉 定 区 结 直 肠 癌 患 者 KRAS 基 因 突 变 率 较 高，靶 向 治 疗 前 进 行 基 因 突 变 检 测 具 有 较 大 意 义。

参 考 文 献

[1] Kasai K, Kon S, Sato N, et al. Case report of lymphoepithelioma-like carcinoma of the lung-lymphoid population consisting of cytotoxic T cells in resting state[J]. Pathol Res Pract, 1999, 195(11): 773-779.

[2] Dunn EF, Lida M, Myers RA, et al. Dasatinib sensitizes KRAS mutant colorectal tumors to cetuximab[J]. Oncogene, 2011, 30(5): 561-574.

[3] Merck, KRAS Fact Sheet, in Merck Serono Oncology 2008; Patms-tadt, Germany.

[4] Karapetis CS, Khambata-Fard S, Jonker DJ, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer[J]. N Engl J Med, 2008, 359(17): 1757-1765.

[5] Doolittle BR, Elmanuel J, Tuttle C, et al. Detection of the mutated K-Ras biomarker in colorectal carcinoma[J]. Exp Mol Pathol, 2001, 70(3): 289-301.

[6] 袁平, 孙孟红, 张锦生, 等. 中国人大肠癌 K-Ras 基因突变的研究[J]. 临床与实验病理学杂志, 2000, 16: 464-466.

[7] 杨蔚蔚, 张玲, 陈慧娟, 等. 某地区结直肠癌患者 K-Ras 基因突变检测结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(19): 2277-2278.

[8] 刘伟, 王丽, 余英豪, 等. k-ras 基因在中国结直肠癌患者中的突变状态[J]. 世界华人消化杂志, 2011, 19(13): 1367-1374.

[9] Meyer P, Sergi C, Garbe, Polymorphisms of the BRAF gene predispose males to malignant melanoma[J]. J Carcinog, 2003, 2(1): 7.

[10] Mikula M, Schreiber M, Husak Z, et al. Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene[J]. EMBO J, 2001, 20(8): 1952-1962.

[11] Smalley KS. A pivotal role for ERK in the oncogenic behaviour of malignant melanoma[J]. Int J Cancer, 2003, 104(5): 527-532.

[12] Fransen K, Klintenas M, Osterstrom A, et al. Mutation analysis of the BRAF, ARAF and RAF-1 genes in human colorectal adenocarcinomas[J]. Carcinogenesis, 2004, 25(4): 527-533.

[13] Oliveira C, Velho S, Moutinho C, et al. KRAS and BRAF oncogenic mutations in MSS colorectal carcinoma progression[J]. Oncogene, 2007, 26(1): 158-163.

(收稿日期: 2012-02-01)