

• 论 著 •

## 358 例肺癌患者 K-ras 基因的突变分析

卢丽琴<sup>1</sup>, 李 纲<sup>2△</sup>

(1. 浙江省人民医院肿瘤内科, 浙江杭州 310014; 2. 上海复旦大学附属肿瘤医院闵行分院肿瘤科, 上海 201100)

**摘要:**目的 分析 358 例肺癌患者 K-ras 基因突变的突变情况, 为肺癌患者的个性化治疗提供指导。方法 通过嵌套和低变性温度下的复合 PCR(COLD-PCR)-测序法分析 358 例肺癌患者 K-ras 基因突变状态。结果 在 358 例肺癌患者中, K-ras 基因总体突变率为 8.10%。94 份血浆标本、250 份肿瘤组织标本、14 份胸腔积液及腹水标本中的突变率分别为 2.13%、9.60%、7.14%。突变类型包括 G12C、G12D、G12A、G12V、G13D、Q61H, 3 种不同标本之间 K-ras 基因的突变率比较, 差异无统计学意义 ( $P=0.0648$ ); 男性与女性患者的突变率分别为 6.96%、8.59%, 差异无统计学意义 ( $P=0.5740$ ); 30~<45 岁、45~<60 岁、大于或等于 60 岁患者中的突变率分别为 4.76%、5.34%、9.22%, 不同年龄段患者 K-ras 基因的突变率比较, 差异无统计学意义 ( $P=0.2503$ )。结论 肺癌患者 K-ras 基因突变类型主要为 G12C、G12D、G12V、G13D, K-ras 基因在不同标本类型、不同性别、不同年龄之间的突变率无明显差异。

**关键词:**肺癌; K-ras 基因; 基因突变状态

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.03.013

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)03-0321-03

## Analysis of K-ras gene mutation in 358 cases of lung cancer

Lu Liqin<sup>1</sup>, Li Gang<sup>2△</sup>

(1. Department of Oncology, Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou, Zhejiang 310014, China; 2. Department of Oncology, Minhang Branch Hospital, Affiliated Tumor Hospital of Fudan University, Shanghai 201100, China)

**Abstract:** Objective To analyze the mutation situation of K-ras gene in 358 cases of lung cancer to provide the guidance for the personalized therapy of lung cancer. **Methods** The nested and low denatured temperature compound PCR(COLD-PCR) method was used to analyze the K-ras mutations situation in 358 patients with lung cancer. **Results** In 358 lung cancer patients, the total mutation frequency of K-ras gene was 8.10%. The mutation rates were 2.13% in 94 plasma samples, 9.60% in 250 tumor tissue samples and 7.14% in 14 pleural and ascites samples. The mutation types included G12C, G12D, G12A, G12V, G13D and Q61H, the mutation rate had no statistical difference among 3 kinds of samples ( $P=0.0648$ ); the mutation rate was 6.96% in male patients and 8.59% in female patients, the difference was not statistically significant ( $P=0.5740$ ); the mutation rates were 4.76% in the patients aged 30~<45 years old, 5.34% in the patients aged 45~<60 years old and 9.22% in the patients aged  $\geq 60$  years old, the differences were not statistically significant ( $P=0.2503$ ). **Conclusion** The mutation types of K-ras gene are mainly G12C, G12D, G12V and G13D. The mutation rate of K-ras gene has no significant differences among different types of sample, different genders and different ages.

**Key words:** lung cancer; K-ras; gene mutation status

世界卫生组织 2014 年报告指出, 癌症是世界范围内导致死亡的首要原因, 2012 年有 1 400 万新发癌症病例, 820 万人因癌症死亡, 新发病例数预计还将增加。2012 年, 男性发病率最高的是肺癌、前列腺癌、结直肠癌、胃癌和肝癌, 女性发病率最高的是乳腺癌、结直肠癌、肺癌、宫颈癌和胃癌。肺癌是引起人类死亡最多的一种癌症。世界新发病例中超过 60% 发生在非洲、亚洲和中南美洲, 主要是由于吸烟、饮酒、不健康饮食和缺乏锻炼所引起。

肺癌是世界上发病率和病死率最高的恶性肿瘤, 包括小细胞肺癌(SCLC)和非小细胞肺癌(NSCLC), 后者占了 80%, 大部分确诊的肺癌患者都处在晚期或已经发生了转移<sup>[1]</sup>, 化疗是这部分患者可选的一种治疗方法, 但也只能增加几个月的生存期<sup>[2]</sup>, 表皮生长因子受体(EGFR)信号通路在细胞的增殖、生长、分化和迁移中发挥着重要的作用, 这条通路的下游因子包括 RAS/RAF/MAPK, 编码这条通路蛋白的基因突变可能都会影响到针对 EGFR 信号通路设计的靶向药物的疗效, 因此, 对这部分基因的检测, 就成为药物能否使用的一个预测性生物

标记物<sup>[3-6]</sup>。**1 材料与方**

**1.1 标本来源** 358 份临床标本来自全国上百家三级医院 358 例肺癌患者, 包括 94 份血浆标本、250 份组织标本和 14 份胸腔积液及腹水标本; 其中来自男性 230 份, 来自女性 128 份; 来自 30~<45 岁患者 21 份, 45~<60 岁患者 131 份,  $\geq 60$  岁患者 206 份。所有参与本研究的肺癌患者或其家属均签署授权书, 对上海赛安生物医药科技有限公司进行 K-ras 基因检测知情同意。

**1.2 仪器与试剂** 离心机购自湘仪离心机仪器有限公司, PCR 仪购自杭州博日科技有限公司, PCR 产物序列测定由上海鼎安生物科技有限公司完成。DNA 提取试剂盒购自 Axygen Scientific Inc, Pfu 酶购自上海申能博彩生物科技有限公司, dNTP 购自上海申能博彩生物科技有限公司。

**1.3 检测方法** (1)基因组 DNA 的提取按照试剂盒说明书进行。(2)低变性温度下的复合 PCR(COLD-PCR)-测序法检测 K-ras 基因突变状态。用 primer 5 进行引物设计, 由英潍捷

基(上海)贸易有限公司合成,嵌套和 COLD-PCR-测序法被用于检测 K-ras 基因的突变。第 1 步进行 PCR 扩增,常规 PCR 反应体系(10 μL)包括 0.25 mmol/L 的 dNTP、0.5 μmol/L 的引物、0.5 单位的 Taq DNA 聚合酶和 10 ng 的模板 DNA。PCR 程序如下:95 °C 预变性 3 min,接着进行 32 个扩增循环,94 °C 30 s,57 °C 30 s,72 °C 30 s,然后 72 °C 保持 5 min。常规 PCR 方法被用于扩增 465 bp 的大片段。所用引物为:正向 5'-GTC GAT GGA GGA GTT TGT AAA TGA AGT-3' 和反向 5'-TTC AGA TAA CTT AAC TTT CAG CAT AAT TAT CTT G-3'。第 2 步进行 COLD-PCR,COLD-PCR 反应体系(50 μL)包括:0.25 mmol/L 的 dNTP、0.5 μmol/L 的引物、0.5 单位的 Taq DNA 聚合酶和 1 μL 的大片段 PCR 产物。PCR 程序如下:95 °C 预变性 3 min;先进行 40 个扩增循环,80 °C 30 s,58 °C 30 s,72 °C 30 s;随后进行 15 个扩增循环,94 °C 30 s,58 °C 30 s,72 °C 30 s;然后 72 °C,保持 5 min。COLD-PCR 方法用于扩增 155 bp 的小片段。所用引物为:正向 5'-GTC ACA TTT TCA TTA TTT TTA TTA TAA GG-3'和反向 5'-TTT ACC TCT ATT GTT GGA TCA TAT TC-3'。第 3 步进行 PCR 产物纯化测序,由上海鼎安生物科技有限公司完成。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS20.0 软件进行数据处理及统计学分析,计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 PCR 产物测序结果** 采用 COLD-PCR-测序法检测 K-ras 基因突变状态,其代表性结果见图 1,显示肺癌患者 K-ras 基因第 13 位密码子由 GGC 突变为 GAC。

**2.2 不同标本类型肺癌患者 K-ras 基因的突变情况** 本研究检

测了 358 例肺癌患者,K-ras 基因总体突变率为 8.10%。94 份血浆标本的突变率为 2.13%,250 份组织标本的突变率为 9.60%,14 份胸腔积液及腹水标本的突变率为 7.14%,突变类型包括 G12C、G12D、G12A、G12V、G13D、Q61H,3 种不同标本 K-ras 基因的突变率比较,差异无统计学意义( $P=0.0648$ ),见表 1。

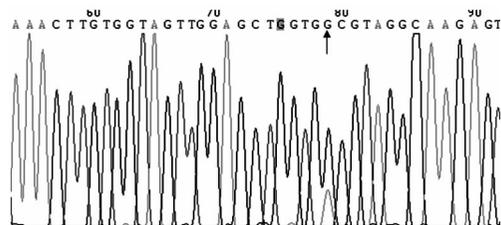


图 1 对 COLD-PCR 产物测序的代表性图谱

**2.3 不同性别肺癌患者 K-ras 基因的突变情况** K-ras 基因在 230 例男性患者中的突变率为 6.96%,突变类型包括 G12C、G12D、G12A、G12V、G13D,在 128 例女性患者中的突变率为 8.59%,突变类型包括 G12D、G12V、G13D、Q61H。不同性别 K-ras 基因的突变率比较,差异无统计学意义( $P=0.5740$ ),见表 1。

**2.4 不同年龄群体肺癌患者 K-ras 基因的突变情况** K-ras 基因在 21 例 30~<45 岁患者中的突变率为 4.76%,突变类型为 G13D,131 例 45~<60 岁患者中的突变率为 5.34%,突变类型包括 G12C、G12D、G12V、G13D,206 例大于或等于 60 岁患者中的突变率为 9.22%,突变类型包括 G12C、G12D、G12A、G12V、G13D、Q61H。不同年龄段患者 K-ras 基因的突变率比较,差异无统计学意义( $P=0.2503$ ),见表 1。

表 1 采用 COLD-PCR-测序法检测肺癌患者 K-ras 基因的突变频率[n(%)]

突变类型	突变位点	标本类型			性别		年龄(岁)		
		血浆 (n=94)	肿瘤组织 (n=250)	胸腔积液及 腹水(n=14)	男性 (n=230)	女性 (n=128)	30~<45 (n=21)	45~<60 (n=131)	≥60 (n=206)
G12S	GGT→AGT	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
G12R	GGT→CGT	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
G12C	GGT→TGT	0(0.00)	2(0.8)	0(0.00)	2(0.87)	0(0.00)	0(0.00)	1(0.76)	1(0.49)
G12D	GGT→GAT	0(0.00)	9(3.60)	1(7.14)	6(2.61)	4(3.13)	0(0.00)	3(2.29)	7(3.40)
G12A	GGT→GCT	1(1.06)	0(0.00)	0(0.00)	1(0.43)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	1(0.49)
G12V	GGT→GTT	0(0.00)	6(2.40)	0(0.00)	4(1.74)	2(1.56)	0(0.00)	1(0.76)	5(2.43)
G13S	GGC→AGC	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
G13R	GGC→CGC	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
G13C	GGC→TGC	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
G13D	GGC→GAC	1(1.06)	6(2.40)	0(0.00)	3(1.30)	4(3.13)	1(4.76)	2(1.53)	4(1.94)
G13A	GGC→GCC	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
G13V	GGC→GTC	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
Q61K	CAA→AAA	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
Q61L	CAA→CTA	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
Q61H	CAA→CAT	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)
Q61H	CAA→CAC	0(0.00)	1(0.4)	0(0.00)	0(0.00)	1(0.78)	0(0.00)	0(0.00)	1(0.49)
合计	—	2(2.13)	24(9.60)	1(7.14)	16(6.96)	11(8.59)	1(4.76)	7(5.34)	19(9.22)

—:无数据。

**3 讨论**

循环肿瘤细胞(CTCs)是原发肿瘤转移过程中释放的中间产物,它有潜力为研究肿瘤的特征提供可用的生物活性物质,从而监测肿瘤的治疗,CTCs 能从血液中富集,并通过

CellSearch®系统进行计数,目前这种方法已经被美国食品药品监督管理局(FDA)批准用于肺癌的相关检测,判断药物反应和疗效<sup>[7-9]</sup>。但是 CTCs 最大的问题是如何有效地富集血液中的肿瘤细胞,由于患者个体差异较大,血液成分异常复杂,所含肿瘤

细胞的比例也有很大差异,研究出一种普遍适用又高效的富集方法成为大家研究的热点。

肺癌患者化疗后的癌转移是影响患者生存的一个重要原因,目前有研究认为这种转移是由于患者体内还存在肺癌干细胞。如何识别、分离这些细胞,从而研究他们的遗传和蛋白上的变化,开发出针对性的药物成为将来研究的方向<sup>[10-11]</sup>。

越来越多的研究发现,肺癌患者存在致癌基因突变,且以一种互斥的方式存在,这些癌基因包括 EGFR、Kras、ALK、MET 等<sup>[12]</sup>。这些致癌基因的突变有些能预测小分子酪氨酸激酶抑制剂靶向疗法的疗效<sup>[13-14]</sup>。所以,在确定一种给药方案前,往往要同时检测几个基因的突变情况。本研究发现在 Kras 第 12 位密码子中存在 4 种突变,包括 G12C、G12D、G12A、G12V,在第 13 位密码子中也存在 2 种突变,包括 G13D、Q61H,这些不同的突变对药物的疗效是否有不同的影响,虽然已经有些研究<sup>[15]</sup>,但还需要更多证据的支持。

参考文献

[1] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2009[J]. CA Cancer J Clin, 2009, 59(4): 225-249.  
 [2] Paz-Ares LG, De Marinis F, Dediu M, et al. Paramount: final overall survival results of the phase III study of maintenance pemetrexed versus placebo immediately after induction treatment with pemetrexed plus cisplatin for advanced nonsquamous non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2013, 31(23): 2895-2902.  
 [3] Dacic S, Flanagan M, Ciepły K, et al. Significance of EGFR protein expression and gene amplification in non-small cell lung carcinoma [J]. Am J Clin Pathol, 2006, 125(6): 860-865.  
 [4] Dziadziuszko R, Witta SE, Cappuzzo F, et al. Epidermal growth factor receptor messenger RNA expression, gene dosage, and gefitinib sensitivity in non-small cell lung cancer[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(10): 3078-3084.  
 [5] Reungwetwattana T, Dy GK. Targeted therapies in development

for non-small cell lung cancer[J]. J Carcinog, 2013, 67(22): 257-274.  
 [6] Sergina NV, Moasser MM. The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets[J]. Trends Mol Med, 2007, 13(12): 527-534.  
 [7] Krebs MG, Hou JM, Sloane R, et al. Analysis of circulating tumor cells in patients with non-small cell lung cancer using epithelial marker-dependent and-independent approaches[J]. J Thorac Oncol, 2012, 7(2): 306-315.  
 [8] Hiltermann TJ, Pore MM, van den Berg A, et al. Circulating tumor cells in small-cell lung cancer: a predictive and prognostic factor[J]. Ann Oncol, 2012, 23(11): 2937-2942.  
 [9] Hou JM, Krebs MG, Lancashire L, et al. Clinical significance and molecular characteristics of circulating tumor cells and circulating tumor microemboli in patients with small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2012, 30(5): 525-532.  
 [10] Otto WR. Lung epithelial stem cells[J]. J Pathol, 2002, 197(4): 527-535.  
 [11] Giangreco A, Arwert EN, Rosewell IR, et al. Stem cells are dispensable for lung homeostasis but restore airways after injury[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(23): 9286-9291.  
 [12] Pao W, Girard N. New driver mutations in non-small-cell lung cancer[J]. Lancet Oncol, 2011, 12(2): 175-180.  
 [13] Nebhan C, Pao W. Further advances in genetically informed lung cancer medicine[J]. J Thorac Oncol, 2013, 8(5): 521-522.  
 [14] Nadal E, Chen G, Prensner JR, et al. KRAS-G12C mutation is associated with poor outcome in surgically resected lung adenocarcinoma[J]. J Thorac Oncol, 2014, 9(10): 1513-1522.  
 [15] Ihle NT, Byers LA, Kim ES, et al. Effect of KRAS oncogene substitutions on protein behavior: implications for signaling and clinical outcome[J]. J Natl Cancer Inst, 2012, 104(3): 228-239.

(收稿日期: 2015-09-28)

(上接第 320 页)

单项检测时, HE4 的灵敏度、特异度最佳,提示 HE4 是诊断卵巢癌的最佳单项指标,与相关文献报道一致<sup>[9-10]</sup>。与单项检测相比, HE4、CA125、CA199 和 CA724 联合检测的灵敏度及阴性预测值均得到提高。

本研究对不同临床分期的卵巢癌检出率进行了比较,结果显示, HE4 和 CA125 诊断 I、II 期卵巢癌患者的灵敏度明显低于 III、IV 期卵巢癌患者,说明 HE4、CA125 检测卵巢癌的阳性率与临床分期关系密切,对中老年卵巢癌的诊断灵敏度更高。HE4、CA125、CA199 和 CA724 联合检测后, I、II 期卵巢癌的阳性率分别升高至 80.0%、87.5%,提示联合检测能够明显提高 I、II 期卵巢癌患者诊断的阳性率,有利于早期诊断。但本研究由于卵巢癌 I、II 期样本量较小,上述结论还需扩大样本量以进一步证实。

综上所述, HE4、CA125、CA199 和 CA724 联合检测可明显提高卵巢癌诊断的灵敏度,对临床卵巢癌的早期发现、诊断,以及病情判断和疗效监测有着重要的临床价值。

参考文献

[1] Ozols RF, Bookman MA, Connolly DC, et al. Focus on epithelial ovarian cancer[J]. Cancer Cell, 2004, 5(1): 19-24.

[2] 刘露, 张木坤, 陈景连, 等. 血清 CA125、CA199 和 CEA 联合检测在卵巢癌诊断中的意义[J]. 重庆医学, 2011, 40(24): 2423.  
 [3] 王新艳. 联合检测血清 CEA、CA125、CA724、SF 在卵巢癌疾病中的诊断价值探讨[J]. 中外健康文摘, 2011, 8(45): 234-235.  
 [4] 厉建兰, 费萍, 徐凤亮. 探讨血清 CA125、CA724、CEA、AFP 联合检测诊断卵巢癌的临床应用价值[J]. 中国实用医刊, 2013, 40(2): 47-48.  
 [5] 朱辉, 宋勇, 解佳妹. 血清 CA125、CA199 与 CEA 联合检测在卵巢癌诊断中的意义[J]. 淮海医药, 2014, 32(4): 379-380.  
 [6] 范文勇. 血浆 CA125 在不同妇科疾病中的表达水平及其疗效的评估价值[J]. 中国当代医药, 2011, 18(3): 33-34.  
 [7] 高雁荣, 黄伟娟. 血清 Mesothelin 和 CA125 联合检测上皮性卵巢癌诊断中的意义[J]. 现代肿瘤医学, 2012, 20(1): 138-140.  
 [8] 王秀宏. 血清肿瘤标志物在卵巢癌诊断中的应用[J]. 黑龙江医学, 2013, 37(5): 373-377.  
 [9] 田园, 胡卫平, 江文静. 人附睾蛋白 4 在卵巢癌早期诊断及预后监测中的应用进展[J]. 医学综述, 2013, 19(13): 2349-2351.  
 [10] 颜彦, 柳洲, 刘大庆, 等. CA125、HE4 及 OPN 联合检测对卵巢癌诊断的诊断价值[J]. 中国临床医学, 2013, 20(4): 440-442.

(收稿日期: 2015-10-10)