

• 论 著 •

560 例中国结直肠癌患者 K-ras 基因突变研究^{*}姚 晖,汪杰华,李 莉,龚金兰,吴晓峰,陈风华[△]

(上海市杨浦区市东医院 200438)

摘要:目的 探讨结直肠癌患者 K-ras 基因突变状态并为个体化治疗提供指导。方法 采用嵌套和 COLD-PCR 的方法分析 560 例结直肠癌患者 K-ras 基因突变状态。结果 560 例患者 K-ras 基因总体突变率 27.08%,128 例血浆标本突变率为 0,432 例组织标本突变率为 27.08%。突变类型包括 G12S、G12C、G12D、G12A、G12V、G13R、G13C、G13D、Q61K、Q61L,2 种不同 K-ras 基因突变率比较,差异有统计学意义($P < 0.0001$)。362 例男性患者的突变率为 20.44%,包括 G12S、G12C、G12D、G12V、G13R、G13C、G13D、Q61K、Q61L;198 例女性患者的突变率为 21.72%,包括 G12S、G12C、G12D、G12A、G12V、G13R、G13D,不同性别间 K-ras 基因突变率比较,差异无统计学意义($P = 0.7227$)。80 例年轻患者的突变率为 20%,包括 G12S、G12C、G12D、G12V、G13D;127 例中年患者的突变率为 33.07%,包括 G12S、G12D、G12A、G12V、G13R、G13C、G13D、Q61K、Q61L;353 例老年患者的突变率为 16.71%,包括 G12C、G12D、G12V、G13R、G13D,不同年龄间 K-ras 基因突变率比较,差异有统计学意义($P = 0.0005$)。结论 560 例结直肠癌患者 K-ras 基因突变类型主要为 G12D、G12V、G13D,K-ras 基因突变在不同标本类型、不同年龄间存在差异,不同性别间无差异。

关键词:结直肠癌; K-ras 基因; 基因突变

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.19.022

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)19-2715-03

Analysis of K-ras gene mutation status in 560 Chinese colorectal cancer patients

YAO Hui, WANG Jiehua, LI Li, GONG Jinlan, WU Xiaofeng, CHEN Fenghua[△]

(Shanghai Shidong Hospital, Shanghai 200438, China)

Abstract: Objective To analyze the mutation status of K-ras gene in colorectal cancer patients, further more, to provide guidance for personalized therapy for colorectal cancer. **Methods** Nested and COLD-PCR were used to detect the K-ras mutations in 560 patients with colorectal cancer. **Results** In 560 colorectal cancer patients, the total positive rate of K-ras gene mutations was 27.08%, the mutation rate was 0 in 128 plasma samples and it was 27.08% in 432 tissue samples. The mutate sites were G12S, G12C, G12D, G12A, G12V, G13R, G13C, G13D, Q61K, Q61L, there were significant differences existed in different samples ($P < 0.0001$); the mutation rate of 362 male patients was 20.44% and the types of mutation include G12S, G12C, G12D, G12V, G13R, G13C, G13D, Q61K and Q61L. The mutation frequency was 21.72% in 198 female patients, the mutation points were G12S, G12C, G12D, G12A, G12V, G13R and G13D. There were no significant difference between different sex ($P = 0.7227$); the mutation frequency was 20% in 80 youth patients including G12S, G12C, G12D, G12V, G13D and the mutation rate was 33.07% in 127 middle age patients, the points of mutation were G12S, G12D, G12A, G12V, G13R, G13C, G13D, Q61K, Q61L, the mutation frequency was 16.71% in 353 old age patients, the types of mutation include G12C, G12D, G12V, G13R, G13D, the difference was significant among different age patients ($P = 0.0005$). **Conclusion** The total rate of mutations is 27.08% in 560 colorectal cancer patients, and the main points of mutation is G12D, G12V, G13D. There are significant differences in different type of samples as well as in different ages, but no statistical significance in different sex patients.

Key words: colorectal cancer; K-ras; gene mutation status

癌症是全球性疾病,具有高发病率,高病死率的特点^[1-2]。2012 年结直肠癌的病死率高达 69 万人^[3]。科学家很早就发现结直肠癌患者存在表皮生长因子受体(EGFR)信号通路的突变,针对 EGFR 信号通路的靶向药物(西妥昔单抗等)得到开发,其疗效也在实践中被证实^[4]。EGFR 下游信号激活通路中的 RAS 和 RAF 基因,而这些基因常包含致癌突变,其中 K-ras 突变率为 30%~60%,B-raf 为 5%~20%,N-ras 为 1%~3%^[5-7]。本研究采用嵌套和 COLD-PCR 方法研究 560 例中国人结直肠癌患者 K-ras 基因突变状态,并比较不同标本、性别和年龄间 K-ras 基因突变频率的差异,为西妥昔单抗药物的使用提供参考依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究使用的临床标本来自全国上百家三级医院的患者,包括 128 例血浆标本和 432 例组织标本。所有参与本研究的患者或其家属均签署授权上海赛安生物医药科技有限公司进行 K-ras 基因检测的知情许可同意书。

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

1.3 基因组 DNA 提取 按照试剂盒说明书进行操作。

^{*} 基金项目:上海市卫计委重点项目(201540032)。作者简介:姚晖,男,主任医师,主要从事临床肿瘤放射治疗研究。 [△] 通讯作者,E-mail:13761246568@163.com。

1.4 COLD-PCR 测序法检测 K-ras 基因突变 采用 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 测序法用于检测 K-ras 基因突变。(1)PCR 扩增:常规 PCR 方法扩增 465 bp 大片段。所用引物:正向 5'-GTC GAT GGA GGA GTT TGT AAA TGA AGT-3',反向 5'-TTC AGA TAA CTT AAC TTT CAG CAT AAT TAT CTT G-3'。10 μ L PCR 反应体系,包括 0.25 mM 的 dNTP、0.5 μ M 的引物、0.5 单位的 Taq DNA 聚合酶和 10 ng 的模板 DNA。95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,32 个扩增循环:94 $^{\circ}$ C 30 s,57 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,然后 72 $^{\circ}$ C,保持 5 min。(2)COLD-PCR:COLD-PCR 方法用于扩增 155 bp 的小片段。所用引物:正向 5'-GTC ACA TTT TCA TTA TTT TTA TTA TAA GG-3',反向 5'-TTT ACC TCT ATT GTT GGA TCA TAT TC-3'。50 μ L 的 PCR 反应体系,包括 0.25 mM 的 dNTP、0.5 μ M 的引物、0.5 单位的 Taq DNA 聚合酶和 1 μ L 的大片段 PCR 产物。95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,40 个扩增循环:80 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s;15 个扩增循环:94 $^{\circ}$ C 30 s,58 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,然后 72 $^{\circ}$ C,保持 5 min。(3)PCR 产物纯化测序:由上海鼎安生物科技有限公司完成。

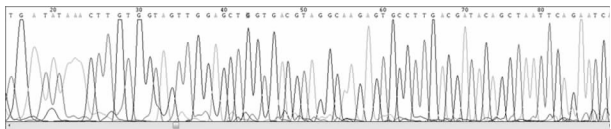
1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析,计数资料组间比较使用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 PCR 产物测序结果 采用 COLD-PCR 测序方法,检测 K-ras 基因突变状态。见图 1。

2.2 不同类型结直肠癌患者 K-ras 基因突变 560 例患者 K-ras 基因总体突变率为 27.08%,包括 128 例血浆标本和 432 例

组织标本,血浆标本突变率为 0,组织标本突变率为 27.08%,突变类型包括 G12S、G12C、G12D、G12A、G12V、G13R、G13C、G13D、Q61K、Q61L,2 种不同标本 K-ras 基因突变率比较,差异有统计学意义($P<0.0001$)。见表 1。



注:COLD-PCR 产物测序的代表性图谱,表示 K-ras 基因第 13 位密码子由 GGC 突变为 GAC。

图 1 K-ras 基因突变状态

2.3 不同性别结直肠癌患者 K-ras 基因突变 362 例男性患者的突变率为 20.44%,突变类型包括 G12S、G12C、G12D、G12V、G13R、G13C、G13D、Q61K、Q61L;198 例女性患者的突变率为 21.72%,包括 G12S、G12C、G12D、G12A、G12V、G13R、G13D,不同性别 K-ras 基因突变率比较,差异无统计学意义($P=0.7227$)。见表 1。

2.4 不同年龄结直肠癌患者 K-ras 基因突变 80 例年轻患者的突变率为 20%,突变类型包括 G12S、G12C、G12D、G12V、G13D;127 例中年患者的突变率为 33.07%,包括 G12S、G12D、G12A、G12V、G13R、G13C、G13D、Q61K、Q61L;353 例老年患者的突变率为 16.71%,包括 G12C、G12D、G12V、G13R、G13D,不同年龄患者 K-ras 基因突变率比较,差异有统计学意义($P=0.0005$)。见表 1。

表 1 COLD-PCR 测序法检测患者不同标本类型、性别、年龄的 K-ras 基因突变频率[n(%)]

基因类型	K-ras 基因突变	标本类别			性别		年龄(岁)		
		血浆 (n=128)	组织 (n=432)	其他 (n=0)	男性 (n=362)	女性 (n=198)	年轻(23~44) (n=80)	中年(45~59) (n=127)	老年(60~90) (n=353)
G12S	GGT>AGT	0(0)	5(1.16)	0(0)	2(0.55)	3(1.52)	2(2.5)	3(2.36)	0(0)
G12R	GGT>CGT	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
G12C	GGT>TGT	0(0)	5(1.16)	0(0)	3(0.83)	2(1.01)	1(1.25)	0(0)	4(1.13)
G12D	GGT>GAT	0(0)	51(11.81)	0(0)	28(7.73)	23(11.62)	11(13.75)	21(16.54)	19(5.38)
G12A	GGT>GCT	0(0)	1(0.23)	0(0)	0(0)	1(0.51)	0(0)	1(0.79)	0(0)
G12V	GGT>GTT	0(0)	25(5.79)	0(0)	18(4.97)	7(3.54)	1(1.25)	9(7.09)	15(4.25)
G13S	GGC>AGC	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
G13R	GGC>CGC	0(0)	2(0.46)	0(0)	1(0.28)	1(0.51)	0(0)	1(0.79)	1(0.28)
G13C	GGC>TGC	0(0)	1(0.23)	0(0)	1(0.28)	0(0)	0(0)	1(0.79)	0(0)
G13D	GGC>GAC	0(0)	25(5.79)	0(0)	19(5.25)	6(3.03)	1(1.25)	4(3.15)	20(5.67)
G13A	GGC>GCC	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
G13V	GGC>GTC	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
Q61K	CAA>AAA	0(0)	0(0)	1(0.23)	1(0.28)	0(0)	1(0.79)	0(0)	0(0)
Q61L	CAA>CTA	0(0)	0(0)	1(0.23)	1(0.28)	0(0)	1(0.79)	0(0)	0(0)
Q61H	CAA>CAT	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
合计		0(0)	27.08	0(0)	20.44	21.72	20.00	33.07	16.71

3 讨 论

ras 家族包括 H-ras、N-ras、K-ras,这些基因是人类癌症中变化最频繁的群组之一^[8]。K-ras 癌基因参与 PI3K/PTEN/AKT 和 RAF/MEK/ERK 的信号通路^[9-10]。因此 K-ras 突变

占人类癌症中 ras 突变的 85%,N-ras 占 15%,H-ras 仅占 0.12%~1%^[11]。

目前检测 EGFR 信号通路下游的癌基因(如 K-ras)突变状态是必需的,目的是区分患者,并让一部分患者从抗-EGFR

的疗法中获益^[12-14]。此外,一些具有预后价值的基因(如 B-raf)也会一起被检测,除了测序法,MALDI MS 方法因高灵敏度、高特异性、检测时间短和样品处理容易而受到关注^[15]。由于免疫组织化学方法对标本的要求低、费用低,也受到部分学者的应用,但由于无法区分突变型和野生型 K-ras 肿瘤患者而受到一定的限制,设计针对突变型 K-ras 的单克隆抗体也就成为将来发展的一个方向^[16]。

致谢:本研究受到上海赛安生物医药科技有限公司彭南求及赵新泰教授的技术支持。

参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Ward E and forman D: global cancer statistics[Z]. 2011;69-90.
- [2] Siegel R. Naishadham D and jemal: a cancer statistics, 2013[Z]. 2013;11-30.
- [3] Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, et al. GLOBOCAN 2012 v1. 1, cancer incidence and mortality world wide: IARC cancer base No. 11, Lyon, 2014. <http://globocan.iarc.fr>. Accessed; 20 Apr 2015.
- [4] Fang JY, Richardson BC. The MAPK signalling pathways and colorectal cancer[J]. Lancet Oncology, 2005, 6(5): 322-327.
- [5] Tougeron D, Lecomte T, Pages J, et al. Effect of low-frequency KRAS mutations on the response to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer[J]. Journal of Clinical Oncology, 2012, 30(15): 1267-1273.
- [6] Yuan ZX, Wang XY, Qin QY, et al. The prognostic role of BRAF mutation in metastatic colorectal cancer receiving Anti-EGFR monoclonal antibodies: a Meta-Analysis[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e65995.
- [7] De Roock W, Claes B, Bernasconi D, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective

- consortium analysis[J]. Lancet Oncol, 2010, 11(8): 753-762.
- [8] Cox AD, Der CJ. Ras history; the saga continues[J]. Small GTPases, 2010, 1(1): 2-27.
- [9] Ruzzo A, Graziano F, Canestrari E, et al. Molecular predictors of efficacy to anti-EGFR agents in colorectal cancer patients[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2010, 10(1): 68-79.
- [10] Tentler JJ, Nallapareddy S, Tan AC, et al. Identification of predictive markers of response to the MEK1/2 inhibitor selumetinib(AZD6244) in K-ras-Mutated colorectal cancer[J]. Mol Cancer Ther, 2010, 9(12): 3351-3362.
- [11] Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes; the first 30 years[J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(6): 459-465.
- [12] Tol J, Nagtegaal ID, Punt CJ. BRAF mutation in metastatic colorectal cancer[J]. N Engl J Med, 2009, 361(1): 98-99.
- [13] Lievre A, Laurent-Puig P. Predictive value of KRAS mutations in chemoresistant CRC[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2009, 6(6): 306-307.
- [14] Laurent-Puig P, Cayre A, Manceau G, et al. Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(35): 5924-5930.
- [15] 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[Z]. 2010;101.
- [16] Piton N, Borrini F, Bolognese A, et al. KRAS and BRAF mutation detection: is immunohistochemistry a possible alternative to molecular biology in colorectal cancer[J]. Gastroenterol Res Pract, 2015, 23(4): 753-759.

(收稿日期:2016-02-24 修回日期:2016-04-19)

(上接第 2714 页)

参考文献

- [1] 黄啸,蔡树模,范建立,等.晚期卵巢上皮性癌的综合治疗和预后分析[J].中华妇产科杂志,2002,37(5):291-293.
- [2] Kerbrat P, Lhomme C, Fervers B, et al. Ovarian cancer[J]. Br J Cancer, 2001, 84(Suppl 2): 18-23.
- [3] Hellström I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M, et al. The HE4(WT-DC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma[J]. Cancer Res, 2003, 63(13): 3695-3700.
- [4] 张琼,余娟平,徐伟文. HE4 在早期卵巢癌诊断中的价值[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2013, 5(1): 44-45.
- [5] 宁映霞,邓宇傲,曹建国. DFOG 抑制卵巢癌 A2780 细胞系球形成细胞自我更新与活化 FoxO3a 相关[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2014, 20(2): 1-4.
- [6] 胡月子,张冉. IL12B 基因多态性与卵巢癌的相关性研究[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2012, 18(1): 25-27.
- [7] 马玉霞,乔惠珍. 子宫内膜癌中癌基因 C-erbB-2 雌激素调节蛋白雌孕激素受体的表达相关性及其临床意义[J]. 内

- 蒙古医学杂志, 2005, 37(7): 577-580.
- [8] 杨金巧,陈琳,幸天勇. 乳腺癌中 C-erbB-2 癌基因与雌、孕激素受体和 PS2 的关系及其预后意义[J]. 四川大学学报(医学版), 2004, 35(3): 334-336.
- [9] Bruno S, Darzynkiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells[J]. Cell Prolif, 1992, 25(1): 31-40.
- [10] 王殊,张嘉庆,乔新民,等. 乳腺癌雌激素受体亚型与表皮生长因子受体-2 表达的关系[J]. 中国妇产科临床杂志, 2005, 6(1): 54-56.
- [11] 姜展红,杨丽,崔娣,等. 癌相关基因蛋白在子宫内膜癌中表达[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2010, 24(6): 569-571.
- [12] 侯庆香,刘蕊,侯庆伦,等. CD44v6 和 C-erbB-2 在子宫内膜癌中的表达[J]. 中国基层医药, 2006, 13(11): 1844-1846.

(收稿日期:2016-03-21 修回日期:2016-05-16)