

· 论 著 ·

314 例中国胃癌患者 K-ras 基因的突变状态分析*

彭南求, 赵新泰[△]

(上海赛安生物医药科技有限公司, 上海 201900)

摘要:目的 分析胃癌患者 K-ras 基因突变状态, 以期为胃癌患者的个性化治疗提供指导。方法 采用嵌套和 COLD-PCR 的方法分析 314 例胃癌患者 K-ras 基因突变状态。结果 在 314 例胃癌患者中, K-ras 基因总体突变率是 7.32%。19 例血浆标本的突变率为 0%。295 例组织标本的突变率为 7.80%。突变类型包括 G12D、G13D、G12V, 两种不同标本之间 K-ras 基因的突变率并无显著差异($P=0.2061$); 221 例男性患者的突变率为 6.79%, 突变类型包括 G12D、G13D, 93 例女性患者的突变率为 8.60%, 突变类型包括 G12D、G13D、G12V, 不同性别之间 K-ras 基因的突变率之间无显著差异($P=0.5731$); 45 例青年人患者的突变率为 6.67%, 突变类型包括 G12D、G13D, 127 例中年人患者的突变率为 7.87%, 突变类型包括 G12D、G13D、G12V, 142 例老年人患者的突变率为 7.04%, 突变类型包括 G12D、G13D, 不同年龄患者 K-ras 基因的突变率之间无显著差异($P=0.9953$)。结论 314 例胃癌患者 K-ras 基因突变率是 7.32%, 突变类型主要为 G12D、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并无显著差异。

关键词: 胃癌; K-ras; 基因突变状态

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2015.24.003

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2015)24-3514-03

Analysis of K-ras gene mutation status in 314 Chinese patients with gastric cancer*

Peng Nanqiu, Zhao Xintai[△]

(Shanghai Shines Pharmaceuticals Co., Ltd., Shanghai 201900, China)

Abstract: Objective To analyze the mutation status of K-ras gene in the patients with gastric cancer to provide the guidance for the personalized therapy of gastric cancer. **Methods** The nested and Cold-PCR were adopted to analyze the K-ras gene mutation status in 314 cases of gastric cancer. **Results** In 314 cases of gastric cancer, the total mutation rate of K-ras gene was 7.32%. The mutation rate was 0% in 19 plasma samples and 7.80% in 295 tissue samples. The types of mutation included G12D, G13D, G12V, the mutation rate of K-ras gene had no statistically significant difference between the two kinds of different samples ($P=0.2061$); the mutation rate was 6.79% in 221 male patients, the types of mutation included G12D, G13D, the mutation frequency is 8.60% in 221 female patients, the types of mutation include G12D, G13D, G12V, the mutation rate of K-ras gene had no statistically significant difference between different genders ($P=0.5731$); the mutation rate was 6.67% in 45 youth patients, the types of mutation included G12D, G13D, the mutation rate was 7.87% in 127 middle age patients, the types of mutation included G12D, G13D, G12V, the mutation rate was 7.04% in 142 old age patients, the types of mutation included G12D, G13D, there was no statistically significant difference among different age patients ($P=0.9953$). **Conclusion** The mutation rate of K-ras gene is 7.32% in 314 cases of gastric cancer, the main mutation types include G12D and G13D, and the mutation rate of K-ras gene has no significant difference among different samples, between different sexes and among different ages.

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

癌症是一种高发病率、高病死率的全球性疾病, 仅在 2008 年就造成 760 万人死亡。过去的 10 年中, 癌症的病死率呈现降低的趋势, 大约 118 万癌症患者得到了有效的救治^[1-2]。胃癌是最常见的消化道肿瘤之一, 其发病率和病死率一直居高不下, 虽然手术可以根治, 但术后的复发转移严重影响患者的生存, 由于缺乏对晚期胃癌及复发型胃癌的有效治疗方案, 目前胃癌的病死率居全世界恶性肿瘤的第 2 位^[3], 对胃癌的早发现、早治疗是提高临床疗效和降低病死率的有效方法^[4]。K-ras 基因编码的 p21-ras 蛋白位于质膜上转导细胞生长与分化的信号。K-ras 突变主要发生在 12、13 和 61 编码子上, 这些突变造成 K-ras 激活^[5]。K-ras 突变与患者缺乏对 EGFR 单抗的反应有关, 突变者不适用西妥昔单抗治疗^[6]。NCCN 2010 年临床指南中推荐: 在接受西妥昔单抗治疗前, 进行 K-ras 基因突变检测, 确定是否接受该靶向治疗。

本研究采用嵌套和 COLD-PCR 方法研究了 314 例中国人胃癌肿瘤血液标本中 K-ras 基因的突变状态, 同时比较了不同标本、性别和年龄群体中 K-ras 基因突变频率的差异, 以期能为西妥昔单抗药物的使用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 标本来源 本研究使用的临床标本来自全国上百家三级医院, 包括 19 例血浆标本和 295 例组织标本。所有参与本研究的胃癌患者或其家属均签署过授权给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 试验使用的 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, DNA 提取试剂盒购自 Axygen Scientific Inc, 所使用的 PCR 仪则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, PCR 产物序列测定由上海鼎安生物科技有限公司

* 基金项目: 上海市科委课题(13DZ2293100)。 作者简介: 彭南求, 男, 主管检验技师, 主要从事肿瘤个性化医疗工作。 [△] 通讯作者, E-mail: zhaoxintai@shineschina.com.

完成。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 的提取 按照试剂盒说明书进行。

1.3.2 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 PCR 扩增,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'。10 μL PCR 反应体系,包括:0.25 mmol 的 dNTP、0.5 mmol 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,72 °C 5 min。

第 2 步 COLD-PCR 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'。用 50 μL 的 PCR 反应体系,包括:0.25mmol 的 dNTP、0.5 μmol 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,72 °C,5 min。

第 3 步 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,结果比较采用 χ² 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-测序的方法,检测 K-ras 基因突变状态,其代表性结果如图 1 所示。对 COLD-PCR 产物测序的代表性图谱,指示胃癌患者 K-ras 基因第 12 位密码子由 GGT 突变为 GAT。

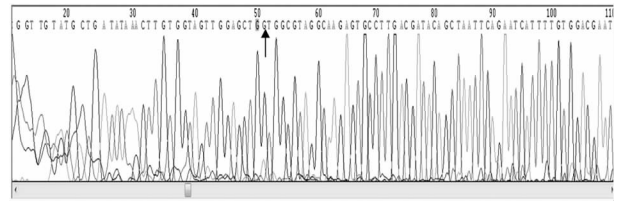


图 1 COLD-PCR 产物测序的代表性图谱

2.2 不同标本类型胃癌患者 K-ras 基因的突变情况 本研究检测了 314 例胃癌患者,K-ras 基因总体突变率是 7.32%。包括 19 例血浆标本和 295 例组织标本,血浆标本的突变率为 0%,组织标本的突变率为 7.80%,突变类型包括 G12D、G13D、G12V,两种不同标本之间 K-ras 基因的突变率并无显著差异(P=0.206 1),详见表 1。

2.3 不同性别胃癌患者 K-ras 基因的突变情况 K-ras 基因在 221 例男性患者的突变率为 6.79%,突变类型包括 G12D、G13D,在 93 例女性患者的突变率为 8.60%,突变类型包括 G12D、G13D、G12V,不同性别之间 K-ras 基因的突变率之间无显著差异(P=0.573 1),详见表 1。

2.4 不同年龄群体胃癌患者 K-ras 基因的突变情况 K-ras 基因在 45 例青年人患者的突变率为 6.67%,突变类型包括 G12D、G13D,127 例中年人患者的突变率为 7.87%,突变类型包括 G12D、G13D、G12V,142 例老年人患者的突变率为 7.04%,突变类型包括 G12D、G13D,不同年龄患者 K-ras 基因的突变率之间无显著差异(P=0.995 3),详见表 1。

表 1 胃癌患者不同标本类型、性别、年龄群体中 K-ras 基因的突变频率

| 氨基酸变化 | K-ras 突变 | 突变频率 | | | | | | | |
|-------|----------|--------------|-----------------|-----------------|---------------|--------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| | | 标本类型 | | | 性别 | | 年龄(岁) | | |
| | | 血浆 (n=19) | 肿瘤组织 (n=295) | 胸、腹腔积液 (n=0) | 男性 (n=221) | 女性 (n=93) | 青年人(23~<45) (n=45) | 中年人(45~<60) (n=127) | 老年人(60~90) (n=142) |
| G12S | GGT>AGT | — | — | — | — | — | — | — | |
| G12R | GGT>CGT | — | — | — | — | — | — | — | |
| G12C | GGT>TGT | — | — | — | — | — | — | — | |
| G12D | GGT>GAT | — | 12(4.07) | — | 7(3.17) | 5(5.38) | 2(4.44) | 6(4.72) | 4(2.82) |
| G12A | GGT>GCT | — | — | — | — | — | — | — | — |
| G12V | GGT>GTT | — | 1(0.34) | — | — | 1(1.08) | — | 1(0.79) | — |
| G13S | GGC>AGC | — | — | — | — | — | — | — | — |
| G13R | GGC>CGC | — | — | — | — | — | — | — | — |
| G13C | GGC>TGC | — | — | — | — | — | — | — | — |
| G13D | GGC>GAC | — | 10(3.39) | — | 8(3.62) | 2(2.15) | 1(2.22) | 3(2.36) | 6(4.23) |
| G13A | GGC>GCC | — | — | — | — | — | — | — | — |
| G13V | GGC>GTC | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Q61K | CAA>AAA | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Q61L | CAA>CTA | — | — | — | — | — | — | — | — |
| Q61H | CAA>CAT | — | — | — | — | — | — | — | — |
| 合计 | | — | 7.80 | — | 6.79 | 8.60 | 6.67 | 7.87 | 7.04 |

—:无数据。

3 讨 论

哺乳动物 ras 基因家族包括 H-ras、K-ras、N-ras 基因,分别编码 H-ras、K-ras、N-ras 蛋白,它们具有相似的结构和功

能。Ras 蛋白位于细胞膜内侧,将 EGFR 的信号转导给促分裂原活化蛋白激酶(MAPKs),从而控制细胞的生长、增殖、运动,以及转移和血管生成^[7]。K-ras 基因通常在第 12、13 和 61 位

密码子上发生点突变,这些突变常常激活 K-ras 癌基因^[8]。K-ras 基因的突变状态和靶向 EGFR 单克隆抗体的治疗效果相关,K-ras 基因突变的患者,不适合爱必妥治疗^[9]。

多种方法被用于改进检测的灵敏度,如变性高效液相色谱(DHPLC)^[10]、嵌套等位基因特异性阻滞剂(ASB-)PCR^[11]、PCR 单链构象多态性(SSCP)^[12]、限制性片段长度多态性(RFLP)^[13]、以及扩增阻滞突变系统(ARMS)等^[14]。由于对设备的要求简单,且灵敏度高,COLD-PCR(在较低的变性温度-PCR)是当前最广泛使用的方法,它能富集不同的 DNA 片段,改进检测的灵敏度^[15-16]。

虽然手术是根治胃癌患者的最好方法,但由于很多患者发现时已经是胃癌晚期,因此,化疗药物的使用就显得很重要,其中多西他赛就是典型,它通过阻断细胞分裂,达到抑制细胞增殖的目的^[17],从而提高患者的无进展期和生存期,改善生活质量。术后复发转移是导致治疗失败的重要原因,现在已经有好多标志物可以预测复发情况的发生,比如 SOX-2、Beta-catenin 等,通过检测它们的表达,可以较好地预测胃癌患者术后的复发转移^[18-19]。

K-ras 基因突变虽然不能作为胃癌患者的个体化治疗指标,但是个体化医疗是新兴的治疗癌症方法,它结合了分子生物学的手段,能更好地针对每个人的情况采取量体裁衣的治疗,从而缩短治疗的时间、提高生存期、改善患者的生活质量。

参考文献

[1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Ward E and forman D: global cancer statistics[J]. *Ca Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.

[2] Siegel R. Naishadham D and jemal a: cancer statistics[J]. *Ca Cancer J Clin*, 2013, 63(1): 11-30.

[3] Matsueda S, Graham DY. Immunotherapy in gastric cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(7): 1657-1666.

[4] 李岩. 胃癌肿瘤标志物及临床意义[J]. *实用医院临床杂志*, 2011, 8(1): 11-15.

[5] Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Bollag ghyperactive ras in developmental disorders and cancer[J]. *Nat Rev cancer*, 2007, 7(1): 295-308.

[6] Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, et al. Oncogenic activation of the RAS-RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti EGFR antibody therapies[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(6): 2643-2648.

[7] Bos JL. Ras oncogenes in human cancer; a review[J]. *Cancer Res*, 1989, 49(17): 4682-4689.

[8] Schubbert S. Shannon K and bollag G: hyperactive Ras in developmental disorders and cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(4): 295-

308.

[9] Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, et al. Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies[J]. *Cancer Research*, 2007, 53(19): 2643-2648.

[10] Lilleberg SL, Durocher J, Sanders C, Walters K and culver K: high sensitivity scanning of colorectal tumors and matched plasma DNA for mutations in APC, TP53, K-RAS, and BRAF genes with a novel DHPLC fluorescence detection platform[J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2004, 1022(1): 250-256.

[11] Mostert B, Jiang Y, Sieuwerts AM, et al. KRAS and BRAF mutation status in circulating colorectal tumor cells and their correlation with primary and metastatic tumor tissue[J]. *Cancer Research*, 2013, 73(2): 130-141.

[12] Abdul MN, Othman Z, Khalid M, et al. missense mutations in MLH1, MSH2, KRAS, and APC genes in colorectal cancer patients in Malaysia[J]. *Dig Dis Sci*, 2012, 57(11): 2863-2872.

[13] Sinha R, Hussain S, Mehrotra R, et al. Kras gene mutation and RASSF1A, FHIT and MGMT gene promoter hypermethylation: indicators of tumor staging and metastasis in adenocarcinomatous sporadic colorectal cancer in Indian population [J]. *Plos One*, 2013, 8(4): 60142.

[14] Bando H, Yoshino T, Tsuchihara K, et al. KRAS mutations detected by the amplification refractory mutation system-Scorpion assays strongly correlate with therapeutic effect of cetuximab[J]. *Brit J Cancer*, 2011, 105(3): 403-406.

[15] Carotenuto P, Roma C, Cozzolino S, et al. detection of KRAS mutations in colorectal cancer with fast COLD-PCR[J]. *Intern J Oncol*, 2012, 40(2): 378-384.

[16] Pennycuik A, Simpson T, Crawley D, et al. routine EGFR and KRAS mutation analysis using COLD-PCR in non-small cell lung cancer[J]. *Intern J Clin Pract*, 2012, 66(8): 748-752.

[17] Unek IT, Akman T, Oztop I, et al. Bimonthly regimen of high-dose leucovorin, infusional 5-fluorouracil, docetaxel, and cis-platin (modified DCF) in advanced gastric adenocarcinoma[J]. *Gastric Cancer*, 2013, 16(3): 428434.

[18] Kormish JD, Sinner D, Zorn AM. Interactions between SOX factors and Wnt/beta-catenin signaling in development and disease [J]. *Dev Dyn*, 2010, 239(1): 56-68.

[19] Huang J, J LI, Qu Y, et al. The expression of claudin 1 correlates with p-catenin and is a prognostic factor of poor outcome in gastric cancer[J]. *Int J Oncol*, 2014, 44(4): 1293-1301.

(收稿日期: 2015-07-19)

(上接第 3513 页)

Latin American. SENTRY Participants Group[J]. *Inter J An Agents*, 2000, 12(2): 257-271.

[2] 王国权, 李丹, 吴琼, 等. 菌血症患者感染危险因素分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2014, 14(12): 2952-2954.

[3] 许能锋, 李阳, 修崇英, 等. 医院内菌血症危险因素病例对照研究[J]. *中国公共卫生*, 2001, 17(3): 209-210.

[4] 叶晓涛, 诗慧明, 张旭, 等. 降钙素原及血培养阳性时间对严重败血症早期预后的价值[J]. *中华医院感染学杂志*, 2013, 23(16): 4075-4077.

[5] 侯伟伟, 肖倩茹, 江涟, 等. 血清降钙素原作为菌血症预示因子临

床价值的研究[J]. *检验医学*, 2014, 11(8): 802-805.

[6] 张淑青, 王贺永, 李宏芬, 等. 血培养标本中病原菌的分布及药敏分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2011, 21(7): 1472-1474.

[7] Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24, 179 cases from a prospective nationwide surveillance study[J]. *Clin Infec Dis*, 2004, 3(1): 309-317.

[8] 周广涛, 杨健. 血流感染的病原学现状及诊治进展[J]. *实用医学杂志*, 2009, 25(24): 4255-4257.

(收稿日期: 2015-07-12)