

• 论 著 •

早期结直肠癌患者的静脉血 KRAS 基因突变检测*

李代昆¹, 樊超强², 吴荭铃¹, 余雪梅¹, 李文明¹, 薛建江^{1△}

(1. 重庆医科大学附属大学城医院检验科, 重庆 401331; 2. 陆军军医大学第二附属医院消化科, 重庆 400037)

摘要:目的 检测早期结直肠癌患者的静脉血鼠类肉瘤病毒癌基因(KRAS)突变情况。方法 将肠镜留取的患者结直肠癌组织标本进行病理学诊断, 将病理学诊断为腺瘤伴高级别癌变的 24 例患者作为试验组, 诊断为正常的 12 例患者纳入对照组。采用艾德-扩增阻滞突变系统(ARMS)检测标本的 19 种 KRAS 基因突变。结果 试验组 24 例腺瘤伴高级别癌变患者肿瘤发生部位和组织学类型比较, 差异无统计学意义($P>0.05$)。试验组 24 例静脉血和对照组 12 例静脉血标本中 KRAS 基因均未检出突变。结论 早期结直肠癌(和癌前)患者的血液中 KRAS 基因突变量较低, 需要提高检测方法的灵敏度。

关键词: 静脉血; KRAS 基因突变; 结直肠癌; 早期诊断

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.17.008

中图法分类号: R735.3

文章编号: 1673-4130(2020)17-2085-04

文献标识码: A

Detection of KRAS gene mutation in venous blood of early colorectal cancer*

LI Daikun¹, FAN Chaoqiang², WU Jiangling¹, YU Xuemei¹, LI Wenming¹, XUE Jianjiang^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, University-Town Hospital of Chongqing

Medical University, Chongqing 401331, China; 2. Department of Gastroenterology, the Second

Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: **Objective** To detect venous blood murine sarcoma virus oncogene (KRAS) mutations in patients with early colorectal cancer. **Methods** The colorectal cancer tissue specimens from patients with colonoscopy were pathologically diagnosed. A total of 24 patients whose pathological diagnosis was adenoma with high-grade cancer were included in the experimental group, and 12 patients who were diagnosed as normal were included in the control group. The Aide-Amplification Block Mutation System (ARMS) was used to detect 19 KRAS gene mutations in the specimens. **Results** There was no significant difference in tumor location and histological type of 24 patients with adenoma with high-grade cancer in the experimental group ($P>0.05$). No mutations were detected in the KRAS gene in 24 venous blood samples in the test group and 12 venous blood samples in the control group. **Conclusion** The blood of patients with early colorectal cancer (and precancerous) have a low amount of KRAS gene mutations, and the sensitivity of detection methods needs to be improved.

Key words: venous blood; KRAS gene mutation; colorectal cancer; early diagnosis

根据 2018 年全球癌症统计、2015 年中国癌症统计和 2018 年全球癌症在线数据库的资料, 2018 年中国新增癌症病例 430 万, 死亡病例 290 万, 36.4% 死于消化道癌症^[1]; 致癌危险因素中, 环境和生活方式占 40%, 吸烟占 24.5%, 慢性感染占 17%^[2]。中国结直肠癌的发病率和病死率均保持上升趋势, 2015 年中国癌症统计数据显示: 我国结直肠癌发病率、死亡率在全部恶性肿瘤中均位居第 5 位, 其中新发病例 37.6 万, 死亡病例 19.1 万。城市地区远高于农村, 结肠癌

的发病率明显上升^[2]。

直肠癌患者的鼠类肉瘤病毒癌基因(KRAS)是否突变与肿瘤发病机制间具有较大的相关性, 临床研究表明结直肠癌患者的 KRAS 基因突变率为 30%~40%; KRAS 基因突变出现在结直肠癌的早期, 患者的原发灶与转移灶的 KRAS 基因突变情况基本一致^[3]。将 KRAS 基因是否突变作为分子标志物对结直肠癌进行早期筛查, 检测结果对结直肠癌的防治具有重要意义。

* 基金项目: 重庆市卫生计生委医学科研项目(2017MSXM087)。

作者简介: 李代昆, 男, 主管技师, 主要从事临床检验诊断方面的研究。△ 通信作者, E-mail: 1208456960@qq.com。

本文引用格式: 李代昆, 樊超强, 吴荭铃, 等. 早期结直肠癌患者的静脉血 KRAS 基因突变检测[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(17):

PCR 技术使基因突变检测得到了较大的进展。本文采用基于扩增阻滞突变系统 (ARMS) 的荧光定量 PCR 技术检测 KRAS 基因突变,该方法具有简单、方便、快速和灵敏度较高等优点,易于临床开展。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取陆军军医大学第二附属医院 2018 年 6 月至 2019 年 3 月进行肠镜检查的患者为研究对象,诊断标准为结直肠镜检查+病理学诊断。将病理学诊断为腺瘤伴灶性高级别癌变的 24 例患者纳入试验组,将病理学诊断未见异常的 12 例患者纳入对照组。试验组男 14 例,女 10 例;年龄 38~72 岁;乙状结肠腺瘤伴灶性高级别癌变 10 例,升结肠腺瘤伴灶性高级别癌变 6 例,直肠腺瘤伴灶性高级别癌变 8 例;管状结肠腺瘤 14 例,绒毛状结肠腺瘤 10 例。对照组男 6 例,女 6 例;年龄 42~68 岁。试验组纳入标准为病理学诊断为腺瘤伴高级别癌变;排除标准为诊断为非结直肠癌的其他癌症或诊断为肠炎或肠息肉等良性病变。试验组与对照组患者性别、年龄比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 两组一般资料比较[n(%)]

组别	性别		年龄(岁)	
	男	女	<60	≥60
试验组	14(58.33)	10(41.67)	14(58.33)	10(41.67)
对照组	6(50.00)	6(50.00)	5(41.67)	7(58.33)
χ^2	0.64		0.35	
P	0.73		0.48	

1.2 仪器与试剂

1.2.1 试剂 核酸(循环 DNA)提取试剂购自厦门艾德生物医药科技有限公司。Buffer CDL、Digest Solution、DNA Tracer、Buffer CDB、Buffer CDD、Buffer CW1(浓缩液)、Buffer CW2(浓缩液)、Buffer CDE、KRAS 基因突变检测试剂盒(荧光 PCR 法)均购自厦门艾德生物医药科技有限公司。KRAS19 PCR 反应条(引物、探针、镁离子、dNTPs),KRAS19 混合酶(Taq DNA 酶、UNG 酶),KRAS19 阳性对照(质粒

DNA),阴性对照(纯化水)。KRAS19 PCR 反应条组成:KRAS19 反应液 1-11,KRAS19 外控反应液。

1.2.2 仪器 Strata gene Mx3000P 实时荧光定量 PCR 仪购自美国安捷伦公司。

1.3 方法

1.3.1 标本采集和保存 患者做肠镜前,采集肘静脉约 15.0 mL(4 支商品化的乙二胺四乙酸二钾抗凝采血管),缓慢轻柔颠倒采血管 6~8 次(防止静脉血凝集或溶血),3 000 r/min 离心 10 min,在生物安全柜内收集上层血浆(约 8.0 mL),血浆未上机检测前于-80℃冰箱保存。

1.3.2 标本 DNA 提取 按核酸提取试剂(型号:循环 DNA)说明书进行操作,DNA 分离完毕后,使用 Nanodrop 2000 测定 DNA 水平,DNA 水平大于 2 ng/ μ L,吸光度 A_{260}/A_{280} 为 1.8~2.0。DNA 提取后 6 h 内未上机检测应保存于-20℃以下。

1.3.3 PCR 检测流程 PCR 反应体系:DNA 样品 65.8 μ L,KRAS19 混合酶 4.2 μ L,每反应管加入混和好的 PCR 反应物 5 μ L。KRAS19 阳性对照(质粒 DNA)和阴性对照(纯化水)按样品 DNA 的检测步骤操作,对 PCR 检测流程进行质量控制。后统一上机检测,第 1 阶段:95℃、5 min;第 2 阶段:95℃ 25 s,64℃ 20 s,72℃ 20 s,循环 15 次;第 3 阶段:93℃ 25 s,60℃ 35 s,72℃ 20 s,循环 31 次。第 3 阶段 60℃ 时收集 FAM 和 HEX(或 VIC)信号。

1.3.4 结果判断 确定扩增曲线的拐点位置,得到 Ct 值,根据 Ct 值把检测结果分为阴性(Ct 值 ≥ 28)、弱阳性($26\leq$ Ct 值 <28)和强阳性(Ct 值 <26)。

1.4 统计学处理 应用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析,计数资料以例数或百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

KRAS 基因 19 种突变检测结果,试验组(24 例)和对照组(12 例)的血浆 KRAS 基因的突变率都为 0.00%。试验组患者的血浆 KRAS 基因 19 种突变检测结果见表 2。

表 2 试验组患者血浆标本的 KRAS 基因 19 种突变检测结果

检测区段	突变类型	检测例数(n)	突变例数(n)	突变率(%)
KRAS Exon-2	G12D	24	0	0.00
	G12A	24	0	0.00
	G12V	24	0	0.00
	G12S	24	0	0.00
	G12R	24	0	0.00
	G12C	24	0	0.00
	G13D	24	0	0.00
	G13C	24	0	0.00

续表 2 试验组患者血浆标本的 KRAS 基因 19 种突变检测结果

检测区段	突变类型	检测例数(<i>n</i>)	突变例数(<i>n</i>)	突变率(%)
KRAS Exon-3	A59T、Q61K	24	0	0.00
	Q61R、Q61H(183A>C)、Q61L、Q61H(183A>T)	24	0	0.00
KRAS Exon-4	K117N(351A>C)、K117N(351A>T)、A146T、A146V、A146P	24	0	0.00

3 讨 论

KRAS 基因突变检测的常用方法包括 Sanger 法测序、实时荧光定量 PCR 技术、ARMS 技术、高分辨率熔解曲线(HRM)技术等,检测对象主要为癌变组织。Sanger 法测序是检测基因突变的金标准,丁莉等^[4]对 378 例结直肠癌标本进行了检测,KRAS 基因突变率为 34.7%;代云等^[5]对 265 例结直肠癌患者肿瘤组织标本进行了检测,KRAS 基因突变率为 32.1%;孙新超等^[6]对 210 例结直肠癌患者肿瘤组织标本进行了检测,KRAS 基因突变率为 43.8%。实时荧光定量 PCR 技术应用最为广泛,凌云等^[7]检测了 304 例结直肠癌石蜡包埋标本,KRAS 基因突变率为 38.82%;梁跃等^[8]检测了 58 例结直肠癌组织标本,KRAS 基因突变率为 29.31%;负田等^[9]检测了 389 例结直肠癌组织,KRAS 突变率为 42.4%。毛旭华等^[10]采用 HRM 技术检测了 60 例结直肠癌患者石蜡包埋组织标本,KRAS 基因突变率为 36.67%(Sanger 法的突变率结果为 33.33%);MIRANDA 等^[11]采用 HRM-定量 PCR 方法检测了 47 例结直肠癌组织 KRAS 基因的 2 号外显子突变情况,灵敏度和特异度分别为 83.30% 和 96.6%,与第二代测序(NGS)法结果高度一致。

本文采用的方法基于 ARMS,其原理为 PCR 引物的 3'末端位碱基必须与其模板 DNA 互补才能有效扩增。这一方法需先设计等位基因的特异性 PCR 扩增引物,只有引物 3'碱基与模板严格配对才能出现 PCR 扩增带,从而检测出突变。罗妙玲等^[12]检测了 177 例结直肠癌手术切除或穿刺活检标本,KRAS 基因突变率为 37.9%;祝继原等^[13]检测了 144 例结直肠癌患者的手术石蜡标本,KRAS 基因突变率为 43.06%;张莹等^[14]检测了 60 例结直肠癌患者手术切除组织,KRAS 基因突变率为 38.3%。

本文检测了血液标本中 KRAS 基因的突变情况,相关文献较少。李学琴^[15]采用酶切富集-PCR 联合焦磷酸测序技术检测 43 例晚期非小细胞肺癌患者癌组织和外周血,癌组织 KRAS 突变率为 9.30%,静脉血 KRAS 突变率为 6.95%。崔发强等^[16]采用 PCR 法检测 96 例原发性肝癌患者外周血,KRAS 突变率为 9.9%。伍洁^[17]采用 PCR-DNA 直接测序法检测 129 例原发结直肠癌组织标本和静脉血标本,癌组织 KRAS 突变率为 39.53%,静脉血 KRAS 突变率为 32.56%。BOTEZATU 等^[18]采用富集突变 PCR-定

量 DNA 熔解曲线分析(mePCR-qDMA)技术检测 20 例结直肠癌患者的肿瘤组织和血浆 KRAS 基因 2 号外显子 12 和 13 位密码子突变情况,KRAS 基因突变率不一致(组织为 60%、血浆为 25%)。

ARMS 技术尚未大规模应用于血浆标本的检测,本研究尝试检测血浆中 KRAS 基因突变的情况,但结果未检测出 KRAS 基因突变,可能原因有:(1)检测标本例数较少;(2)结直肠癌早期(包括癌前)血液中的 KRAS 突变基因含量较少;(3)检测方法的灵敏度不足以检测到微量 KRAS 基因突变。

4 结 论

静脉血是结直肠癌早期筛查的理想标本,但需要提升检测方法的灵敏度;采取不同方法的联合达到扬长避短的目的,极大提高检测的灵敏度。

参考文献

[1] FENG R M,ZONG Y N,CAO S M,et al. Current cancer situation in China: good or bad news from the 2018 Global Cancer Statistics? [J]. Cancer Commun,2019,39(1):1-12.

[2] 孙燕,顾晋,汪建平. 中国结直肠癌诊疗规范(2017 年版) [J]. 上海医学,2018,41(8):449-463.

[3] 范志军. KRAS 基因突变与结直肠癌的研究进展[J]. 中外医学研究,2017,15(8):163-164.

[4] 丁莉,韩义明,郑杰,等. 结直肠癌中 KRAS 基因突变及意义[J]. 临床与实验病理学杂志,2016,32(10):1156-1159.

[5] 代云,郑国华,李青. 结直肠癌患者 BRAF、KRAS、NRAS 和 PIK3CA 基因突变与其病理特征的关系[J]. 临床与病理杂志,2017,37(5):875-880.

[6] 孙新超,秦旭,王金海,等. 结直肠癌患者肿瘤组织中 KRAS、NRAS、BRAF 基因突变状态分析[J]. 社区医学杂志,2017,15(11):8-11.

[7] 凌云,胡海燕,邱田,等. 结直肠癌患者 KRAS 和 BRAF 基因突变检测及其临床意义[J]. 中国肿瘤临床与康复,2016,23(6):645-649.

[8] 梁跃,李光学,马庆庆. 结直肠癌 KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF 基因联合突变分析及临床意义[J]. 中国社区医师,2018,34(14):107-109.

[9] 负田,王长松,李富林,等. 结直肠癌患者 KRAS、NRAS、BRAF 基因突变与临床病理特征关系的研究[J]. 实用医药杂志,2019,36(8):733-736.

[10] 毛旭华,汤俊明,乔国洪,等. 高分辨率熔解曲线技术检测结直肠癌患者 KRAS 基因突变[J]. 中国肿瘤外科杂志,2017,9(5):296-299.

[11] MIRANDA R R,SILVA T D,FORONES N M. High-resolution melting for detecting KRAS(下转第 2091 页)

降低提示线粒体途径凋亡可能参与 NAFLD 的发生及发展。

本研究发现在 NAFLD 中内质网应激和凋亡率均升高。为探讨内质网对细胞的影响,4-PBA 抑制内质网应激后细胞膜电位下降,Caspase-3、细胞质 CytC 蛋白表达降低,而 Bcl-2 蛋白表达增加,提示内质网应激对 NAFLD 细胞凋亡具有促进作用。既往有学者针对内质网应激与凋亡在 NAFLD 中的关系进行了研究,认为改善内质网应激可以抑制细胞凋亡^[14]。内质网应激可诱导细胞内钙离子稳态失衡,细胞内异常的钙离子水平促使线粒体钙离子超载的发生,线粒体内钙离子的大量增加会打开膜渗透转换孔,膜渗透转换孔开放后引起线粒体膜变化,诱发 CytC 释放启动线粒体途径凋亡^[15-16]。

4 结 论

本研究发现在 NAFLD 细胞凋亡和内质网应激增加,减轻内质网应激后可降低线粒体途径凋亡率,结果提示内质网应激对 NAFLD 的发病有影响。但细胞内质网应激通过何种分子机制诱导细胞线粒体途径凋亡仍有待进一步探讨。

参考文献

[1] 赵泽华,刘晓琳,范建高. 重视非酒精性脂肪性肝病自然史的研究[J]. 中华肝脏病杂志,2017,25(2):81-84.

[2] 常业飞,胡滔,洪颖,等. 高血糖对非酒精性脂肪性肝炎大鼠肝脏超微结构及细胞凋亡的影响[J]. 国际检验医学杂志,2018,39(18):2234-2237.

[3] 敖娜,杨晶,都健. 利拉鲁肽对棕榈酸诱导 HepG2 细胞凋亡的影响及其可能机制[J]. 中华肝脏病杂志,2019,27(6):445-449.

[4] ZHENG Y, QU H, XIONG X, et al. Deficiency of Mitochondrial Glycerol 3-Phosphate Dehydrogenase Contributes to Hepatic Steatosis[J]. Hepatology, 2019, 70(1):84-97.

[5] SHIN S K, CHO H W, SONG S E, et al. Ablation of catalase promotes non-alcoholic fatty liver via oxidative stress and mitochondrial dysfunction in diet-induced obese mice [J]. Pflugers Arch, 2019, 471(6):829-843.

[6] MAIERS J L, MALHI H. Endoplasmic reticulum stress in metabolic liver diseases and hepatic fibrosis[J]. Semin Liver Dis, 2019, 39(2):235-248.

[7] HERNÁNDEZ-ALVAREZ M I, SEBASTIÁN D, VIVES S, et al. Deficient endoplasmic reticulum-mitochondrial phosphatidylserine transfer causes liver disease[J]. Cell, 2019, 177(4):881-895.

[8] SMITH M, WILKINSON S. ER homeostasis and autophagy[J]. Essays Biochem, 2017, 61(6):625-635.

[9] KIM H M, KIM Y, LEE E S, et al. Caffeic acid ameliorates hepatic steatosis and reduces ER stress in high fat diet-induced obese mice by regulating autophagy[J]. Nutrition, 2018, 56:63-70.

[10] KANDA T, MATSUOKA S, YAMAZAKI M, et al. Apoptosis and non-alcoholic fatty liver diseases[J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(25):2661-2672.

[11] BAKER P R, FRIEDMAN J E. Mitochondrial role in the neonatal predisposition to developing nonalcoholic fatty liver disease[J]. J Clin Invest, 2018, 128(9):3692-3703.

[12] 宋霞,陈涛,张炜,等. 高三尖杉酯碱对 HL60 细胞程序性凋亡的影响及机制研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(20):2471-2474.

[13] 郭英. 黄芪甲苷通过抑制 AKT 和 NF- κ B 通路诱导胃癌 MGC-803 细胞凋亡 [J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(19):2341-2344.

[14] TAKAHARA I, AKAZAWA Y, TABUCHI M, et al. Toyocamycin attenuates free fatty acid-induced hepatic steatosis and apoptosis in cultured hepatocytes and ameliorates nonalcoholic fatty liver disease in mice [J]. PLoS One, 2017, 12(3):e0170591.

[15] ZHANG Y, XUE R, ZHANG Z, et al. Palmitic and linoleic acids induce ER stress and apoptosis in hepatoma cells [J]. Lipids Health Dis, 2012, 5(11):1-5.

[16] EGNATCHIK R A, LEAMY A K, JACOBSON D A, et al. ER calcium release promotes mitochondrial dysfunction and hepatic cell lipotoxicity in response to palmitate overload[J]. Mol Metab, 2014, 3(5):544-553.

(收稿日期:2020-01-16 修回日期:2020-04-25)

(上接第 2087 页)

mutations in colorectal cancer. [J]. Biomed Rep, 2019, 11(6):269-273.

[12] 罗妙玲,徐韞健. 结直肠癌 KRAS、BRAF 及 PIK3CA 基因突变状态分析[J]. 热带医学杂志, 2016, 16(7):843-846.

[13] 祝继原,吴鹤,张震,等. 结直肠癌患者 KRAS、NRAS 和 BRAF 基因突变检测分析[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2017, 51(6):500-503.

[14] 张莹,王哲,杨向红. 结直肠癌患者应用 ARMS 法检测 KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF 基因突变分析[J]. 诊断病理学杂志, 2019, 26(8):506-511.

[15] 李学琴. 酶切富集 PCR-焦磷酸测序技术检测 NSCLC 患者癌组织及外周血 KRAS 基因突变[D]. 重庆:第三军医

大学, 2014.

[16] 崔发强,李涛,王铮,等. 原发性肝癌患者外周血 KRAS 基因水平及其对西妥昔单抗克隆抗体治疗疗效的影响[J]. 实用肝脏病杂志, 2019, 22(4):565-568.

[17] 伍洁. 结直肠癌组织和静脉血中 KRAS 基因突变分析及临床意义[J]. 中外医疗, 2016, 35(4):51-52.

[18] BOTEZATU I V, KONDRATOVA V N, SHELEPOV V P, et al. Asymmetric mutant-enriched polymerase chain reaction and quantitative DNA melting analysis of KRAS mutation in colorectal cancer. [J]. Anal Biochem, 2020, 590:113517.

(收稿日期:2020-02-07 修回日期:2020-05-15)