

结直肠癌患者不同组织中 K-ras 基因研究

宋 枫 高 峰 吴伟强 杨增强 徐 明 张 鑫

摘 要 **目的** 研究结直肠癌患者不同组织中 K-ras 基因的临床意义。**方法** 采用实时荧光定量 PCR 方法检测患者原发灶组织 100 例、转移淋巴结组织 64 例、远处转移灶 13 例、腺瘤组织 19 例中 K-ras 基因突变情况。**结果** 结直肠癌原发灶、转移淋巴结组织、远处转移灶、腺瘤组织的 K-ras 基因检出率分别为 100%、92.2%、92.3%、89.5%；K-ras 基因突变率分别为 39.0%、30.5%、33.3%、17.6%。主要突变基因第 12 编码子 34 位 G>T, G>A, G>C, 35 位 G>A, G>T, G>C；第 13 编码子 37 位 G>C, 38 位 G>A 等 8 种基因发生突变。**结论** 结直肠癌原发灶、转移淋巴结组织、远处转移灶的 K-ras 基因突变率基本一致,而腺瘤组织 K-ras 基因突变率明显低于原发灶、转移淋巴结组织、远处转移灶组织。K-ras 基因突变在结直肠癌的发生、发展中起重要作用,这对结直肠癌的防治有重要的指导意义。

关键词 K-ras 基因 结直肠癌 基因突变

中图分类号 R735 **文献标识码** A **DOI** 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.03.021

Research of K-ras Gene of Colorectal Cancer at Different Tissue. Song Feng, Gao Feng, Wu Weiqiang, et al. Department of Colorectal Surgery, Lanzhou General Hospital, Lanzhou Command, PLA, Gansu 730050, China

Abstract **Objective** The Research of K-ras gene of colorectal cancer at different tissue. **Methods** One-hundred primary foci, 64 metastatic lymph nodes, 13 metastatic remoter organs and 19 colorectal adenoma from colorectal cancer patients were collected Real-time fluorescence quantitative PCR were performed to detect K-ras mutations results were analyzed. **Results** The frequency of K-ras detect in primary foci, metastatic lymph nodes, metastatic remoter organs and colorectal adenoma were 100%, 92.2%, 92.3% and 89.5%. The frequency of K-ras mutation in primary foci, metastatic lymph nodes, metastatic remoter organs and colorectal adenoma were 39.0%, 30.5%, 33.3% and 17.6%. The most common mutation of codon was 12 (G>T, G>A, G>C, G>A, G>T, G>C) and codon 13 (G>C, G>A). **Conclusion** The detection of K-ras mutations in primary foci, metastatic lymph nodes, metastatic remoter organs was concordant. K-ras mutations play an important role in the carcinogenesis and development of colorectal cancer.

Key words K-ras gene; Colorectal cancer; Gene mutation

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是一种常见恶性肿瘤。实验证明 K-ras 基因在结直肠癌发生、发展过程中起重要作用^[1-4]。本研究采用实时荧光定量 PCR 方法检测患者结直肠癌原发灶、转移淋巴结组织、远处转移灶、腺瘤组织中 K-ras 基因突变情况,以研究 K-ras 基因在结直肠癌中的突变表达。

材料与方法

1. 研究对象:收集笔者医院 2009 年 1 月~2014 年 1 月手术切除结直肠癌标本 100 例,并取相应患者转移淋巴结组织 64 例、远处转移灶 13 例、腺瘤组织 19 例。其中男性 62 例,女性 38 例;患者年龄 21~87 岁,平均年龄 54.3 岁。肿瘤病理类型:高分化腺癌 11 例,中分化腺癌 38 例,低分化腺癌 49 例,黏液腺癌 2 例。

2. 检测方法:(1)标本采集:结直肠癌原发灶、转移淋巴结组织、远处转移灶、腺瘤组织(直径>0.5cm)取下后应在 1h 内放入 10% 中性甲醛溶液中固定,用量应为组织块的 4~20 倍,固定时间应为 6~48h;在新鲜标本的制备过程中,新鲜组织取下后应立即放入-20℃ 以下冰箱中保存。石蜡样本 DNA 提取(使用 TaKaRa 公司的石蜡样本处理试剂(DEXPAT)),将石蜡包埋组织切成 5μm(4~10μm)厚后,用灭菌小镊子将两枚切片放入 1.5ml EP 管中,包埋组织至少需要 6mm×6mm 大小。具体操作步骤请参照相应人类组织基因组 DNA 提取试剂盒操作说明。(2)K-ras 基因检测:根据 Jhawer 等^[5,6]文献所述,使用北京金菩嘉医疗科技有限公司的 K-ras 基因突变检测试剂盒,该试剂盒结合了 TaqMan 技术和 LNA 钳制技术,采用荧光定量 PCR 方法对 K-ras 基因外显子 2 中第 12、13 编码子发生的基因突变进行定性检测。总反应体系为 20μl,包括反应模板 DNA 2μl,反应混合液 18μl,每次反应均设阴阳性对照。荧光定量 PCR 仪型号为 ABI7300。PCR 反应条件为:50℃ 保温 2min,95℃ 变性 10min,95℃ 15s,69℃ 10s,62℃ 1min,循环 40 次。

基金项目:甘肃省自然科学基金资助项目(1308RJZA154);兰州军区医药卫生科研计划基金资助项目(CLI21JB15)

作者单位:730050 兰州军区兰州总医院肛肠外科

结 果

1. K - ras 基因检出情况:结直肠癌原发灶、转移淋巴结组织、远处转移灶、腺瘤组织、正常组织的 K -

ras 基因检出率分别为 100.0%、92.2%、92.3%、89.5%、100.0%。检出情况见表 1。

表 1 结直肠癌不同组织 K - ras 基因检出情况 [n(%)]

标本	原发灶	转移淋巴结组织	远处转移灶	腺瘤组织	正常组织
n	100	64	13	19	100
检出 K - ras 基因	100	59	12	17	100
检出率	100(100.0)	59(92.2)	12(92.3)	17(89.5)	100(100)

2. K - ras 基因突变情况:结直肠癌原发灶、转移淋巴结组织、远处转移灶、腺瘤组织、正常组织的 K -

ras 基因突变率分别为 39%、30.5%、33.3%、17.6%、0。突变情况见表 2。

表 2 结直肠癌不同组织 K - ras 基因突变情况 [n(%)]

标本	原发灶	转移淋巴结组织	远处转移灶	腺瘤组织	正常组织
n	100	59	12	17	100
野生型	61	41	8	14	100
突变型	39	18	4	3	0
突变率	39(39.0)	18(30.5)	4(33.3)	3(17.6)	0

3. 所检测的 100 例中 K - ras 基因原发灶突变类型:12 编码子突变为 32 例,突变率为 32.0% ,13 编码子突变为 7 例,突变率为 7.0% ;转移淋巴结组织突变类型:12 编码子突变为 16 例,突变率为 27.1% ,13 编码子突变为 2 例,突变率为 3.4% ;远处转移灶突变类型:12 编码子突变为 3 例,突变率为 25.0% ,13 编码子突变为 1 例,突变率为 8.3% ;腺瘤组织突变类型:12 编码子突变为 2 例,突变率为 11.8% ,13 编码子突变为 1 例,突变率为 5.8% ;主要突变基因第 12 编码子 34 位 G > T, G > A, G > C, 35 位 G > A, G > T, G > C; 第 13 编码子 37 位 G > C, 38 位 G > A 等 8 种基因发生突变。突变类型为 G → A 转换、G → T 及 G → C 颠换。原发灶 K - ras 基因突变位点有:34 位 G 突变为 A 12 例、35 位的 G 突变为 A 8 例、38 位的 G 突变为 A 7 例、35 位的 G 突变为 T 6 例、34 位的 G 突变为 T 4 例、35 位的 G 突变为 C 2 例,其中突变率最高的位点为 12 号编码子 34 位 G 突变为 A,突变率为 12.0% ;突变率最低的位点为 35 位的 G 突变为 C,突变率为 2.0%。结直肠癌不同组织 K - ras 基因

突变类型见表 3;野生型及突变型 K - ras 基因实时荧光定量 PCR 扩增曲线图见图 1、图 2。

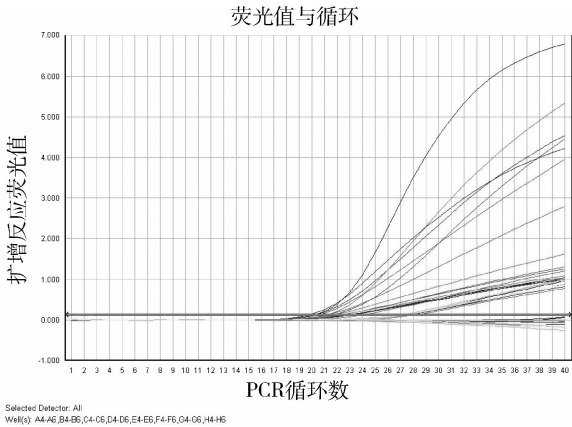


图 1 野生型 K - ras 基因实时荧光定量 PCR 扩增曲线图

讨 论

K - ras 基因属于 Ras 基因家族,位于染色体的 12p12,最常见的激活方式为点突变,突变的位点几乎都集中在 2 号外显子的第 12 位编码子和第 13 位编码子,K - ras 基因突变在大肠癌遗传学改变中最为重要。结直肠癌早期即隐窝异常病灶、腺瘤、癌组织、转移淋巴结组织、远处转移灶中均可检测到基因突变^[7]。本次实验结直肠癌原发灶、转移淋巴结组织、远处转移灶、腺瘤组织的 K - ras 基因突变率分别为 39.0%、30.5%、33.3%、17.6% 与国内报道相同^[8-11],

表 3 结直肠癌不同组织 K - ras 基因突变类型

标本	原发灶 (n = 100)	转移淋巴 结组织 (n = 59)	远处转移灶 (n = 12)	腺瘤组织 (n = 17)
12 编码子	32	16	3	2
13 编码子	7	2	1	1

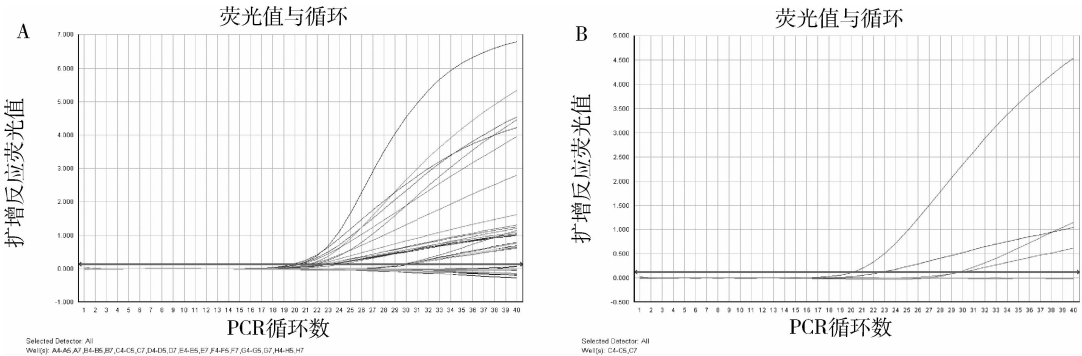


图 2 突变型 K - ras 基因实时荧光定量 PCR 扩增曲线图
A. 全位点扩增图; B. 突变位点扩增图

正常组织未发现 K - ras 基因突变。突变的 K - ras 基因可稳定地处于活化状态并持续其信号传递,导致细胞无控制地增殖并向恶性转化。结直肠癌最常见的是 K - ras 基因第 12、13 位密码子尤其第 12 位密码子错义突变^[12,13]。本次实验 K - ras 基因原发灶突变类型:12 编码子突变为 32 例,突变率为 32.0%,13 编码子突变为 7 例,突变率为 7.0%;转移淋巴结组织突变类型:12 编码子突变为 16 例,突变率为 27.1%,13 编码子突变为 2 例,突变率为 3.4%;远处转移灶突变类型:12 编码子突变为 3 例,突变率为 25.0%,13 编码子突变为 1 例,突变率为 8.3%;腺瘤组织突变类型:12 编码子突变为 2 例,突变率为 11.8%,13 编码子突变为 1 例,突变率为 5.8%。12 编码子突变的结果导致编码的氨基酸发生改变,从而产生具有致癌活性的 P21 蛋白,13 编码子突变则导致天冬氨酸(Asp)取代甘氨酸(Gly),使结直肠癌患者的生存率降低。

通过此研究表明结直肠癌原发灶、转移淋巴结组织、远处转移灶的 K - ras 基因突变率基本一致,而腺瘤组织 K - ras 基因突变率明显低于原发灶、转移淋巴结组织、远处转移灶组织。因此在原发灶组织无法取到时,进行淋巴结或转移灶组织的 K - ras 基因检测具有与原发灶组织 K - ras 基因检测的相同意义。笔者认为 K - ras 基因突变在结直肠癌的发生、发展中起重要作用,这对结直肠癌的防治有重要意义。另外,西妥昔单抗对 K - ras 基因野生型结直肠癌患者有效,所以通过进行结直肠癌患者的 K - ras 基因检测对其治疗有指导意义。

参考文献

1 Garcia M, Jemal A, Ward EM, *et al.* Global cancer facts and figures 2007[R]. Atlanta: American Cancer Society, 2007: 25 - 26

2 Dabritz J, Hanfler J, Preston R, *et al.* Detection of K - ras mutations in tissue and plasma samples of patients with pancreatic using PNA - mediated PCR clamping and hybridization probes [J]. Br J Cancer, 2005, 92(2): 405 - 412

3 Halatsch ME, Hirsch - Ernst KI, Weinel RJ, *et al.* Differential activation of the c - Ki - ras - 2 proto - oncogene in human colorectal carcinoma[J]. Anticancer Research, 1998, 18(4A): 2323 - 2325

4 Zhu D, Xing D, Shen X, *et al.* High sensitive approach for point mutation detection based on electrochemiluminescence [J]. Biosensors Bioelectronics, 2004, 20(3): 448 - 453

5 Jhawer M, Goel S, Wilson AJ, *et al.* PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab [J]. Cancer Res, 2008, 68(6): 1953 - 1961

6 Carmen JA, Milburn JJ, Mark RS, *et al.* American society of clinical oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti - epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy [J]. J Clin Oncol. Doi:10.1200/JCO.2009.21.9170

7 袁平, 孙孟红, 张锦生, 等. 结直肠粘膜腺瘤异常病灶 k - ras、APC 基因突变的研究[J]. 中华病理学杂志, 2001, 30(2): 35 - 38

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

9 唐卫中, 高枫, 李卫, 等. 结直肠癌 APC、K - ras、p53 基因突变检测[J]. 肿瘤, 2006, 26(3): 282 - 284

10 宋枫, 高峰, 杨增强, 等. 结直肠癌中 K - ras 基因突变研究[J]. 实用肿瘤杂志, 2014, 29(1): 33 - 35

11 吴小军, 李清泉, 陈雪芹, 等. 肺癌患者组织和痰液中 p53 基因、K - ras 基因突变[J]. 肿瘤防治研究, 2000, 27(1): 33 - 35

12 Rónán C, Heyer J. KRAS mouse models: modeling cancer harboring KRAS mutations[J]. Genes & Cancer. 2011, 2(3): 335 - 343

13 于振香, 左孟华, 赵珩. 胸水细胞 p53 和 K - ras 基因突变对于肺癌的诊断价值[J]. 中国实验诊断学, 2006, 10(8): 857 - 859

(收稿日期: 2014 - 08 - 15)

(修回日期: 2014 - 09 - 17)