

## 结直肠癌患者 K-ras 基因突变的表达及临床意义研究\*

周政<sup>1</sup>, 陈大鹏<sup>2△</sup>

(1. 重庆三峡中心医院检验科, 重庆万州 404000; 2. 重庆医科大学附属儿童医院检验科, 重庆 400014)

**摘要:**目的 检测结直肠癌患者外周血血浆游离 DNA K-ras 基因突变并探讨其临床意义。方法 提取 212 例结直肠癌患者血浆游离 DNA 并以 Globin 基因确定其存在, 通过 RE-PCR 检测 K-ras 基因突变, 并与病理组织学检查结果进行对比分析。结果 212 例患者血浆游离 DNA 均提取成功, 106 例健康对照组均为阴性。212 例患者中 34 例患者血浆游离 K-ras 突变阳性 (16.00%), 33 例患者病理活检标本阳性 (15.57%), 二者比较差异无统计学意义 ( $\chi^2=2.31, P=0.31$ )。共发现 12 密码子的两种突变方式, 即 GGT 突变为 GAT 和 GGT 突变为 GTT。K-ras 基因突变与肿瘤的部位 (结肠、直肠、弥散分布) 无明显关系 ( $\chi^2=3.34, P=0.61$ ); 与结直肠癌分化程度 (高、中、低) 无明显关系 ( $\chi^2=2.38, P=0.29$ ); 与结直肠癌病理分期 (Dukes 分期) 无明显关系 ( $\chi^2=2.84, P=0.38$ ); 与结直肠癌有无淋巴结转移无明显关系 ( $\chi^2=0.98, P=0.37$ ); 与结直肠癌患者年龄无明显关系 ( $\chi^2=1.86, P=0.39$ )。结论 结直肠癌患者血浆中可以检测出肿瘤源性的血浆游离 DNA; 结直肠癌患者血浆游离 DNA K-ras 基因突变的检测简单、方便、相对无创, 与病理活检标本的检测具有相同的临床意义。

**关键词:** 肿瘤; 结直肠; 血浆; 脱氧核糖核酸; K-ras 基因; 突变

中图分类号: R735.35

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)24-3133-03

## The clinical significance of K-ras mutation detected in plasma cell-free DNA from patients with colorectal carcinoma\*

Zhou Zheng<sup>1</sup>, Chen Dapeng<sup>2△</sup>

(1. Department of Laboratory, Chongqing Three Gorges Central Hospital, Wanzhou, Chongqing 404000, China;

2. Department of Laboratory, Children' Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China)

**Abstract:** Objective To evaluate the clinical significance of K-ras mutation in plasma cell-free DNA from patients with colorectal carcinoma. Methods Plasma cell-free DNA in 212 patients with colorectal carcinoma were extracted and identified by Globin gene. K-ras mutation was amplified by RE-PCR and compared with results of pathological biopsy samples DNA. Results Plasma cell-free DNA were successfully obtained from 212 cases. But no plasma cell-free DNA were found in normal control. Out of 212 cases, 34 cases showed K-ras mutation (16.00%) in cell-free DNA, and 33 cases showed positive in pathological biopsy samples DNA (15.57%). It was found two kinds of K-ras mutation on code 12-GGT to GAT; GGT to GTT. K-ras mutation was not related to tumors' position ( $\chi^2=3.34, P=0.61$ ); to differentiation degree ( $\chi^2=2.38, P=0.29$ ); to Dukes staging ( $\chi^2=2.84, P=0.38$ ); to lymphoid nodes' metastasis ( $\chi^2=0.98, P=0.37$ ); to age ( $\chi^2=1.86, P=0.39$ ). Conclusion Tumor-derived DNA can be detected in plasma of underlying cancer patients. For colorectal carcinoma patients, detecting K-ras mutation of plasma cell-free DNA have the same clinical significance as biopsy samples. Moreover, it's more convenient and non-invasive.

**Key words:** tumor; colorectal carcinoma; plasma; deoxyribonucleic acid; K-ras; mutation

随着人们的行为方式、饮食结构及自然环境的改变, 结直肠癌发病率呈明显上升趋势。尽管作用机制仍未完全清楚, 但多数研究认为 K-ras 基因突变是结直肠癌发生的早期事件, 在结肠腺瘤癌变过程中发挥重要作用。西方人种结、直肠癌原发灶组织的 K-ras 基因突变率为 30%~60%<sup>[1]</sup>, 而东方人种则为 17%~28%<sup>[2]</sup>。西妥昔单抗竞争性阻断表皮生长因子受体 (EGFR) 和其他配体, 从而抑制癌细胞的增殖, 诱导癌细胞的凋亡, 疗效比较明确。但研究表明 K-ras 基因突变可以导致对西妥昔单抗原发性耐药, 检测 K-ras 基因点突变是保证分子靶向治疗有效的关键。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 2010 年 1~11 月, 随机选择本院初诊的 212 例结直肠癌患者。其中, 男 144 例, 女 68 例。按年龄分组: 19~44 岁, 70 例; 45~59 岁, 52 例; 大于 60 岁, 90 例。按肿瘤部位分组: 大肠弥散分布 4 例, 直肠肿瘤 108 例, 结肠肿瘤 100

例; 按肿瘤分化程度分组: 低分化肿瘤 60 例, 中分化肿瘤 144 例, 高分化肿瘤 8 例; 按 Dukes 病理诊断分期分组: A 期 48 例, B 期 72 例, C 期 72 例, D 期 20 例。其中淋巴结转移 84 例。所有患者的临床诊断均由病理组织活检、临床表现、实验室检查确诊。按照 2:1 的比例设对照, 健康对照组由 106 名健康体检人员组成。

## 1.2 方法

**1.2.1 标本处理** 取受试者外周血 3~5 mL 乙二胺四乙酸 (EDTA) 抗凝, 3 000 r/min 离心 15 min 分离血浆, -80 °C 冷冻保存。用 HepG2 细胞作为阳性对照 (HepG2 细胞 DNA 稳定地含有 K-ras 12 密码子突变的 SW480 DNA)。

**1.2.2 DNA 提取** 采用 Qiagen 试剂提取血浆游离 DNA。紫外分光光度仪测定 DNA 含量, 应用 3~5 mL 外周血可获得约 10 μg 游离 DNA。

**1.2.3 扩增** (1) 检测基因组 DNA 看家基因 globin; 引物

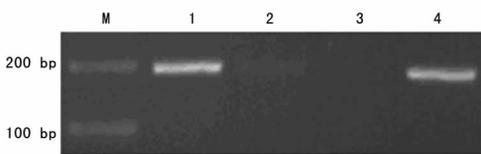
Globin-R:ATC AAG CGT CCC ATA GAC TCA C,Globin-F:  
GAT CTG TCC ACT CCT GAT GCT G,PCR 产物 196 bp。  
扩增条件:94 ℃ 3 min,然后依次 94 ℃ 30 s,59 ℃ 30 s,72 ℃  
30 s,共 35 次循环,最后 72 ℃ 10 min。反应结束后,取 10 μL  
产物进行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳,利用凝胶成像仪观察结果。  
(2)RE-PCR<sup>[3-4]</sup>:第 1 轮 PCR 体系:1.5 μmol/L MgCl<sub>2</sub>,1×  
PCR buffer,0.5 U Hot-Start Taq,200 μmol/L dNTP,0.1  
μmol/L primers[L-Ext(5' GCT CTT CGT GGT GTG GTG  
TCC ATA TAA ACT TGT GGT AGT TGG ACC T 3'),R-  
Ext(5' GCT CTT CGT GGT GTG GTG TCC CGT CCA CAA  
AAT GAT TCT GA 3')。扩增条件:95 ℃ 15 min,94 ℃ 30  
s,52 ℃ 30 s,20 次循环,72 ℃ 5 min 1 次循环。扩增产物用  
BstNI 消化。1/20 的消化产物进行第 2 轮 Hot-Start PCR:1  
μmol/L 引物 L-Bst(5' ACT GAA TAT AAA CTT GTG GTA  
GTT GGA CCT 3'),R-Bst(5' GTC CAC AAA ATG ATC  
CTG GAT TAG C 3')。扩增条件:95 ℃ 15 min,94 ℃ 30 s,  
56 ℃ 30 s,40 次循环,72 ℃ 5 min 1 次循环。87 bp 的扩增产  
物用 BstNI 消化后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。K-ras 阳性认定  
标准:终产物出现 71 bp 大小的片段。K-ras 突变最终经 DNA  
测序确定。

**1.2.4 主要试剂及仪器** DNA 提取试剂盒(组织 DNA 和血  
浆游离 DNA)购自德国 Qiagen 公司;PremixTaq、Hot-Start  
Taq、BstNI 购自德国 Qiagen 公司;引物由上海英骏生物技术  
有限公司合成。紫外分光光度仪、PCR 扩增仪、电泳仪及凝胶  
成像仪为美国 BIO-RAD 公司产品。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS17.0 软件进行分析处理,分类  
资料统计分析采用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

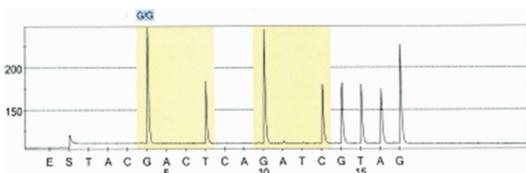
## 2 结果

**2.1 血浆游离 DNA 提取结果** 以看家基因 globin 扩增产物  
电泳作为血浆游离 DNA 提取物的鉴定结果。212 例初诊患者  
标本中,血浆游离 DNA 均提取成功。106 例健康对照组中均  
无血浆游离 DNA 提出(图 1)。肿瘤中心组织均提取出 DNA。



以 196 bp 处出现特异性条带作为游离 DNA 存在的标准。M:标  
准条带;1~4:结肠癌患者血浆游离 DNA 扩增产物。

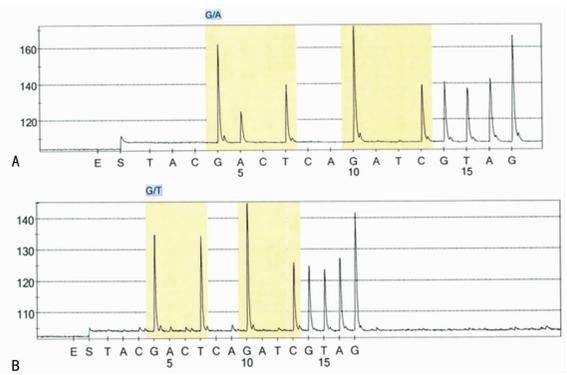
图 1 血浆游离 DNA PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图



K-ras 野生型标准检测图谱(12 密码子 GGT),结果显示检测位点  
为 G/G,表明 K-ras 基因为野生型;显示为其他的碱基(A、C 或 T),则  
表明 K-ras 基因发生突变。

图 2 K-ras 野生型检测图谱

**2.2 肿瘤中心病理组织 K-ras 突变检测结果** 212 例患者中  
发生 K-ras 突变(12 密码子)的有 33 例(15.57%,33/212)。本  
研究共发现 2 个突变类型,12 位密码子由 GGT 突变为 GAT  
(图 2,3);12 位密码子由 GGT 突变为 GTT(图 2,3)。



A:12 密码子检测位点显示为碱基 A(GGT→GAT);B:12 密码子  
检测位点显示碱基由 G 突变为 T(GGT→GTT)。

图 3 K-ras 突变型检测图谱

表 1 血浆游离 DNA K-ras 突变检测结果及与  
病理组织、临床特征的关系

临床特征	n	K-ras 突变(12 密码子)[n(%)]	
		活检组织	血浆游离 DNA
年龄(岁)			
青年(19~44)	70	20(28.57)	21(30.00)
中年(45~59)	52	3(5.77)	3(5.77)
老年(60-)	90	10(11.11)	10(11.11)*
肿瘤部位			
结肠	100	21(21.00)	21(21.00)
直肠	108	9(8.33)	9(8.33)
大肠弥散分布	4	3(75.00)	4(100.00)*
分化程度			
高	8	0(0.00)	0(0.00)
中	144	16(11.11)	16(11.11)
低	60	17(28.33)	18(30.00)*
Dukes 分期			
A	48	6(12.50)	7(14.58)*
B	72	14(19.44)	15(20.83)
C	72	9(12.50)	8(11.11)
D	20	4(20.00)	4(20.00)
淋巴结转移			
有	84	13(15.48)	14(16.67)*
无	128	20(15.63)	20(15.63)
合计	212	33(15.57)	34(16.00)*

\*:  $P > 0.05$ 。

**2.3 血浆游离 DNA K-ras 突变检测结果及与病理组织、临床  
特征的关系** 212 例患者同时进行活检标本和血浆游离 DNA  
K-ras。检测结果 34 例患者血浆游离 K-ras 突变阳性  
(16.04%),33 例患者病理活检标本阳性(15.57%),二者比较  
差异无统计学意义( $\chi^2 = 2.31, P = 0.31$ )。其中,1 例患者肿瘤  
呈大肠弥散分布,2 次病理组织活检结果均为阴性,而其血浆  
游离 DNA 分析结果为阳性,经多次活检后确定为黏液腺癌。

K-ras 基因突变与肿瘤的部位(结肠、直肠、弥散分布)无  
明显关系( $\chi^2 = 3.34, P = 0.61$ );与结直肠癌分化程度(高、中、

低)无明显关系( $\chi^2=2.38, P=0.29$ );与结直肠癌病理分期(Dukes 分期)无明显关系( $\chi^2=2.84, P=0.38$ );与结直肠癌有无淋巴结转移无明显关系( $\chi^2=0.98, P=0.37$ );与结直肠癌患者年龄无明显关系( $\chi^2=1.86, P=0.39$ )。见表 1。

### 3 讨 论

肿瘤细胞持续释放 DNA 入血,导致外周血 DNA 增高且存在与原发肿瘤组织一致的分子生物学改变<sup>[5]</sup>。本研究结果显示肿瘤患者血液中确实存在健康人群不存在或是不能被检出的游离 DNA。血浆游离 DNA 的检出量也与疾病进程相关。本研究在初诊患者中均检测到血浆游离 DNA,而在疾病缓解期的患者中则未检出。在病情逐渐好转的情况下,患者血浆中的游离 DNA 浓度逐渐减低。因此,检测血浆游离 DNA 有助于肿瘤患者疾病进展情况的评估以及预后判断。

ras 基因产物参与控制基因转录的激酶信号传导路径,因而能调节细胞的生长与分化。ras 蛋白随 ras 基因的改变而发生变化,其结果是发生改变的 ras 蛋白不再具有裂解和释放 GTP 分子的能力,这种改变导致该信号传导路径始终处于“开通”的状态,从而导致细胞的生长和增生。ras 过度表达导致持续的细胞增殖,这是肿瘤发生的关键一步,同时涉及多种肿瘤的发生,其中最常见的是结直肠肿瘤。结直肠肿瘤的治疗,外科手术是长期已确定的治疗方案,而新兴的肿瘤分子靶向治疗是一种全新的生物治疗模式<sup>[6-7]</sup>。K-ras 基因是公认的癌基因,参与 EGFR 信号传导过程。基因突变患者抗 EGFR 治疗预后较差,导致不良反应,增加治疗费用;野生型患者就很可能从抗 EGFR 药物治疗中获益。因此,《美国国立癌症综合网络(NCCN)结直肠癌临床实践指南》(2008 年第 3 版)明确提出检测 K-ras 基因。西妥昔单抗阻断 K-ras 蛋白的表达,将凋亡信号传递到胞核内,抑制细胞增殖,促进细胞凋亡。患者对西妥昔单抗原耐药可能与 K-ras 基因突变有关<sup>[8]</sup>,指导分子靶向治疗的关键即是检测 K-ras 基因点突变的存在与否。针对 K-ras 基因点突变的检测,该研究发现血浆游离 DNA 与病理活检标本具有相同的阳性率、一致性和临床意义。其中 1 例患者初次病理活检未查出 K-ras 基因突变阳性,而其相应的血浆游离 DNA 查出 K-ras 基因突变阳性,患者经再次活检后检测出 K-ras 基因突变阳性。分析其原因:该例患者病变呈大肠弥散分布,造成了取材的困难。因此,在未获得病理证据时,血浆游离 DNA 的检测能够提供重要参考价值,为临床的早期诊断、辅助诊断提供帮助,同时也为患者的个体化治疗提供指导性的依据。全身各器官均可释放 DNA 入血,检测血浆游离 DNA 能够反映与体内肿瘤相关的异常基因,是肿瘤基因诊断的一种新方法。

本研究结果显示 K-ras 基因突变(12 密码子)突变率为 15.57%,12 密码子突变有 2 种突变方式(12 密码子由 GGT 突变为 GAT;12 密码子由 GGT 突变为 GTT),与文献报道一致<sup>[9]</sup>。K-ras 基因突变与患者年龄、Dukes 分期、分化程度、肿瘤部位、有无淋巴结转移无明显相关性<sup>[10-13]</sup>。但也有文献<sup>[14]</sup>报道 Dukes C 期发生 K-ras 突变频率最高,结肠肿瘤发生突变频率比直肠高。

肿瘤组织与血浆 K-ras 基因突变率比较差异无统计学意义( $P>0.05$ ),血浆克服了组织标本取材困难的弊端。通过血浆游离 DNA 检测 K-ras 基因突变,方便、无创、快捷,能更好地应用于分子靶向药物的选择和临床综合治疗。

### 参考文献:

- [1] Elbjairami WM, Sughayer MA. K-RAS mutations and subtyping in colorectal cancer in Jordanian patients[J]. *Oncol Lett*, 2012, 4(4):705-710.
- [2] 高枫,唐卫中,李卫. 中国人散发性大肠癌 K-ras 基因突变的研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2010, 22(1):65-67.
- [3] Su YH, Wang M, Brenner DE, et al. Human urine contains small, 150 to 250 nucleotide-sized, soluble DNA derived from the circulation and may be useful in the detection of colorectal cancer[J]. *J Mol Diagn*, 2004, 6(2):101-107.
- [4] Su YH, Wang M, Block TM, et al. Transrenal DNA as a diagnostic tool: important technical notes[J]. *Ann NY Acad Sci*, 2004, 1022:81-89.
- [5] Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, et al. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy[J]. *Cancer Res*, 1977, 37(3):646-650.
- [6] Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids(CNAs) and cancer-a survey[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1775(1):181-232.
- [7] Zavodna K, Konecny M, Krivulcik T, et al. Genetic analysis of K-ras mutation status in metastatic colorectal cancer patients[J]. *Neoplasma*, 2009, 56(3):275-278.
- [8] 吴军. 结直肠癌 K-ras 突变与对西妥昔单抗耐药的实验研究[J]. *外科理论与实践*, 2009, 14(4):396-402.
- [9] Bai YQ, Liu XJ, Wang Y, et al. Correlation analysis between abundance of K-ras mutation in plasma free DNA and its correlation with clinical outcome and prognosis in patients with metastatic colorectal cancer[J]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 2013, 35(9):666-671.
- [10] Rossi L, Veltri E, Zullo A, et al. Metastatic colorectal cancer first-line treatment with bevacizumab: the impact of K-ras mutation[J]. *Onco Targets Ther*, 2013, 6:1761-1769.
- [11] Murray S, Karavasilis V, Bobos M, et al. Molecular predictors of response to tyrosine kinase inhibitors in patients with Non-Small-Cell Lung Cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2012, 31:77.
- [12] Sameer AS. Colorectal cancer: molecular mutations and polymorphisms[J]. *Front Oncol*, 2013, 3:114 [PMID: 23717813 DOI:10.3389/fonc.2013.00114].
- [13] Klatz, Niemeyer M, Zenker M. An unexpected new role of mutant ras: Perturbation of human embryonic development[J]. *J Mol Med*, 2007, 85(3):227-235.
- [14] Deschoolmeester V, Boeckx C, Baay M, et al. K-RAS mutation detection and prognostic potential in sporadic colorectal cancer using high-resolution melting analysis[J]. *Br J Cancer*, 2010, 103(10):1627-1636.