

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.15.004

K-ras 基因状态及 ras 蛋白表达在胃印戒细胞癌免疫表型分类中的意义^{*}

熊秋迎¹,熊 欣¹,胡秀华²,涂露霞¹,熊振芳^{1△}
(1. 南昌大学第一附属医院病理科,南昌 330006;2. 江西省南昌市洪都中医院急诊科 330038)

[摘要] 目的 探讨 K-ras 基因状态及 ras 蛋白表达在胃印戒细胞癌免疫表型分类中的意义。方法 应用组织芯片免疫组织化学技术检测 180 例胃印戒细胞癌组织中 ras 蛋白的表达;PCR 扩增和 DNA 直接测序法检测癌组织中 K-ras 基因 12、13 密码子的突变情况。结果 ras 蛋白阳性 50 例(27.8%),ras 蛋白阳性表达率在肠型印戒细胞癌中显著高于胃型和混合型印戒细胞癌($P<0.05$)。在淋巴结转移阳性组织中,ras 蛋白阳性表达率明显高于无淋巴结转移组织($P<0.05$);随着肿瘤侵袭、演进及临床分期的升高,ras 蛋白阳性表达率明显增高($P<0.05$)。K-ras 基因突变型 22 例(12.2%)。所有突变位点均位于 12 密码子,突变类型包括:GGT→AGT 1 例,GGT→TGT 1 例,GGT→GCT 2 例,GGT→GTT 8 例,GGT→GAT 10 例。13 密码子未发现突变。肠型印戒细胞癌 K-ras 基因突变率显著高于胃型和混合型印戒细胞癌($P<0.05$)。K-ras 基因突变型病例 ras 蛋白阳性表达率明显高于 K-ras 基因野生型病例($P<0.05$)。Spearman 等级相关分析显示,ras 蛋白表达与 K-ras 基因突变呈正相关($r=0.61,P<0.05$)。结论 ras 蛋白的过表达可能与胃印戒细胞癌侵袭潜能、淋巴结转移相关,ras 蛋白表达和 K-ras 基因突变与肿瘤的免疫表型变化存在相关性,它们在癌细胞表型转化过程中可能起到一定作用。

[关键词] 胃肿瘤;基因;ras;蛋白质;印戒细胞癌;K-ras 基因;淋巴结转移;靶向治疗
[中图分类号] R735.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)15-2027-03

Significance of K-ras gene status and ras protein expression in immunophenotypic classification of gastric signet ring cell carcinoma^{*}

Xiong Qiuying¹,Xiong Xin¹,Hu Xiuhua²,Tu Luxia¹,Xiong Zhenfang^{1△}
(1. Department of Pathology,the First Affiliated Hospital of Nanchang University,Nanchang,Jiangxi 330006,China;
2. Department of Emergency Ward,Hongdu Chinese Medicine Hospital,Nanchang,Jiangxi 330038,China)

[Abstract] **Objective** To investigate the significance of K-ras gene status and ras protein expression in immunophenotypic classification of gastric signet ring cell carcinoma. **Methods** The expression of ras protein in 180 cases of gastric signet-ring cell carcinoma was detected by tissue microarray immunohistochemistry. Meanwhile,the mutation in codon 12,13 of K-ras gene was determined by using PCR-based DNA direct sequencing analysis. **Results** The rate of ras protein expression was 27.8%. The rate of ras protein expression in intestinal phenotype was significantly higher than those in gastric and gastrointestinal phenotypes($P<0.05$). The rate of ras protein expression in cases with lymph node metastasis was significantly higher than those in cases without nodal involvement($P<0.05$). The rate of ras protein expression was significantly higher in cases with deeper invasion($P<0.05$). The frequency of K-ras gene mutation was 22(12.2%). All of them were found in codon 12. The types of mutation included GGT→AGT(1 case),GGT→TGT(1 case),GGT→GCT (2 cases),GGT→GTT (8 cases) and GGT→GAT(10 cases). K-ras mutation was significantly associated with intestinal phenotype($P<0.05$). The rates of ras protein expression in cases with mutational type of K-ras gene was higher than those in cases with wild type($P<0.05$). The ras protein expression was positively associated with K-ras gene mutation($r=0.61,P<0.05$). **Conclusion** The ras protein expression is correlated with nodal involvement and invasion. K-ras gene mutation and expression of ras protein is related to phenotypic classification,and they might influence the phenotypic transformation in gastric signet ring cell carcinoma.

[Key words] stomach neoplasms;genes;ras;proteins;signet ring cell carcinoma;K-ras gene;lymph node metastasis;targeting therapy

胃印戒细胞癌是胃腺癌中特殊的组织学亚型,细胞含丰富黏液,该类型主要呈弥漫侵袭性生长,进展迅速,预后差。本研究前期资料显示胃印戒细胞癌的胃肠免疫标记表达模式可能反映肿瘤的演进潜能,说明可能存在不同的分子遗传学背景^[1]。K-ras 基因属于 Ras 基因超家族,是重要的癌基因,第 12、13 密码子点突变是其常见的突变位点,可导致细胞恶性转化。ras 蛋白是表皮生长因子受体(EGFR)传导通路中关键的信号分子,当 K-ras 基因突变后,ras 发生构象变化,从而失去细胞传导作用,刺激细胞分裂、增殖,导致细胞癌变^[2]。目前,

K-ras 基因已成为结直肠癌分子靶向治疗靶点之一。因此,本研究对肠型印戒细胞癌是否存在 K-ras 基因突变,并对其生物学行为及个体化治疗有关的问题进行研究。本研究通过检测 K-ras 基因状态及 ras 蛋白在不同免疫表型胃印戒细胞癌中表达差异,探讨 ras 蛋白和 K-ras 基因与印戒细胞癌的胃、肠分型的关系及其作为分子治疗靶点在靶向治疗中的可能性,为制订个性化治疗方案和评估预后提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集南昌大学第一附属医院病理科 2004 年

^{*} 基金项目:江西省卫生计生委科技计划项目(20155179)。 作者简介:熊秋迎(1976—),主管技师,本科,主要从事肿瘤分子病理学及病理技术方面研究。 △ 通信作者,E-mail:xiongzhenfang0408@126.com。

10 月至 2010 年 12 月手术切除的 180 例胃印戒细胞癌组织,术前未行放、化疗。其中,男 74 例,女 106 例;年龄 16~84 岁,中位年龄 47 岁;黏膜内癌 57 例,早期黏膜下浸润癌 40 例,进展期癌 83 例;有淋巴结转移 77 例,无淋巴结转移 103 例;有脉管浸润 74 例,无脉管浸润 106 例;有神经浸润 60 例,无神经浸润 120 例;TNM 分期中,I 期 91 例,Ⅱ期 10 例,Ⅲ期 33 例,Ⅳ期 46 例。胃印戒细胞癌免疫表型分型:本组前期研究^[1]根据胃印戒细胞癌胃、肠免疫表型标记[胃免疫表型特异性标记物:黏液素(MUC)1、MUC5AC、MUC6;肠免疫表型特异性标记物:MUC2、果蝇相关同源异形框转录因子(CDX2)]表达差异,将其分为 3 型:胃型胃印戒细胞癌(只表达胃免疫表型标记物)67 例,肠型胃印戒细胞癌(只表达肠免疫表型标记物)42 例,混合型胃印戒细胞癌(胃、肠免疫表型标记物均表达)71 例。

1.2 方法

1.2.1 ras 蛋白检测 采用 Envision-IHC 法检测组织芯片中 ras 蛋白的表达情况,ras 蛋白多克隆抗体购自 Novocastra 公司,即用型工作液。以细胞质或细胞膜出现棕黄色颗粒判定为阳性。

1.2.2 PCR 扩增和 DNA 直接测序法检测 K-ras 基因突变 石蜡包埋肿瘤组织 DNA 提取、PCR 扩增,PCR 产物在测序仪(ABI PRISM310)上完成测序,测序试剂为 Big Dye terminator v2.0,采用 DNA Star 软件进行序列分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行处理,计数资料用率表示,组间比较采用 χ^2 检验、Fisher 精确检验和 Spearman 等级相关分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ras 蛋白表达与印戒细胞癌免疫表型分类及临床病理参数的关系 180 例胃印戒细胞癌中,ras 蛋白阳性 50 例,表达率为 27.8%。肠型病例 ras 蛋白阳性表达率显著高于胃型和混合型病例,比较差异有统计学意义($P<0.05$)。在有淋巴结转移病例中,ras 蛋白阳性表达率明显高于无淋巴结转移病例,比较差异有统计学意义($P<0.05$);随着肿瘤侵袭、演进及临床分期的升高,ras 蛋白阳性表达率明显增高,比较差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1、图 1。

2.2 K-ras 基因突变与印戒细胞癌免疫表型分类及临床病理参数的关系 180 例癌组织中,K-ras 基因突变 22 例,突变率为 12.2%。所有突变位点均位于 K-ras 基因 12 密码子,突变类型包括:GGT→AGT 1 例,GGT→TGT 1 例,GGT→GCT 2 例,GGT→GTT 8 例,GGT→GAT 10 例。13 密码子未发现突变。肠型病例 K-ras 基因突变率显著高于胃型和混合型病例,比较差异有统计学意义($P<0.05$)。而 K-ras 基因突变率与临床病理参数之间比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1、图 2。

表 1 不同免疫表型组 K-ras 基因状态及 ras 蛋白表达与临床病理参数的关系

表型分型及 临床病理参数	n	ras 蛋白		K-ras 基因突变	
		阳性[n(%)]	P	阳性[n(%)]	P
表型分型		<0.05		<0.05	
胃型	67	18(26.9)		5(7.5)	
肠型	42	17(40.5)		10(23.8)	
混合型	71	15(21.1)		7(9.9)	
性别		>0.05		>0.05	

续表 1 不同免疫表型组 K-ras 基因状态及 ras 蛋白表达与临床病理参数的关系

表型分型及 临床病理参数	n	ras 蛋白		K-ras 基因突变	
		阳性[n(%)]	P	阳性[n(%)]	P
男	74	20(27.0)		9(12.2)	
女	106	30(28.3)		13(12.3)	
年龄(岁)		>0.05		>0.05	
≤50	71	18(25.4)		9(12.7)	
>50	109	32(29.4)		13(11.9)	
肿瘤大小(cm)		>0.05		>0.05	
≤5.0	81	20(24.7)		10(12.3)	
>5.0	99	30(30.3)		12(12.1)	
浸润深度		<0.05		>0.05	
黏膜内癌	57	10(17.5)		6(10.5)	
早期黏膜下浸润癌	40	13(32.5)		5(12.5)	
进展期癌	83	27(32.5)		11(13.3)	
淋巴结转移		<0.05		>0.05	
有	77	28(36.4)		8(10.4)	
无	103	22(21.4)		14(13.6)	
脉管浸润		>0.05		>0.05	
有	38	9(23.7)		5(13.2)	
无	142	41(28.9)		17(12.0)	
神经侵犯		>0.05		>0.05	
有	60	18(30.0)		8(13.3)	
无	120	32(26.7)		14(11.7)	
TNM 分期		<0.05		>0.05	
I+Ⅱ	101	15(14.9)		12(11.9)	
Ⅲ+Ⅳ	79	35(44.3)		10(12.7)	

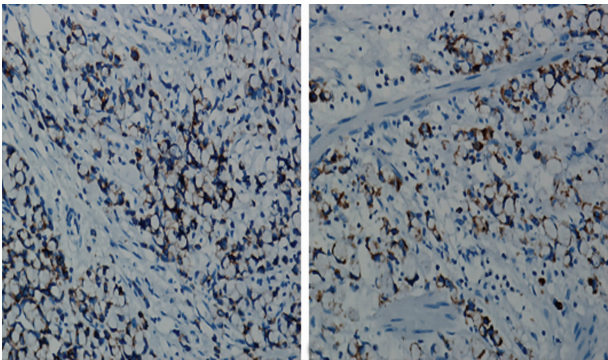
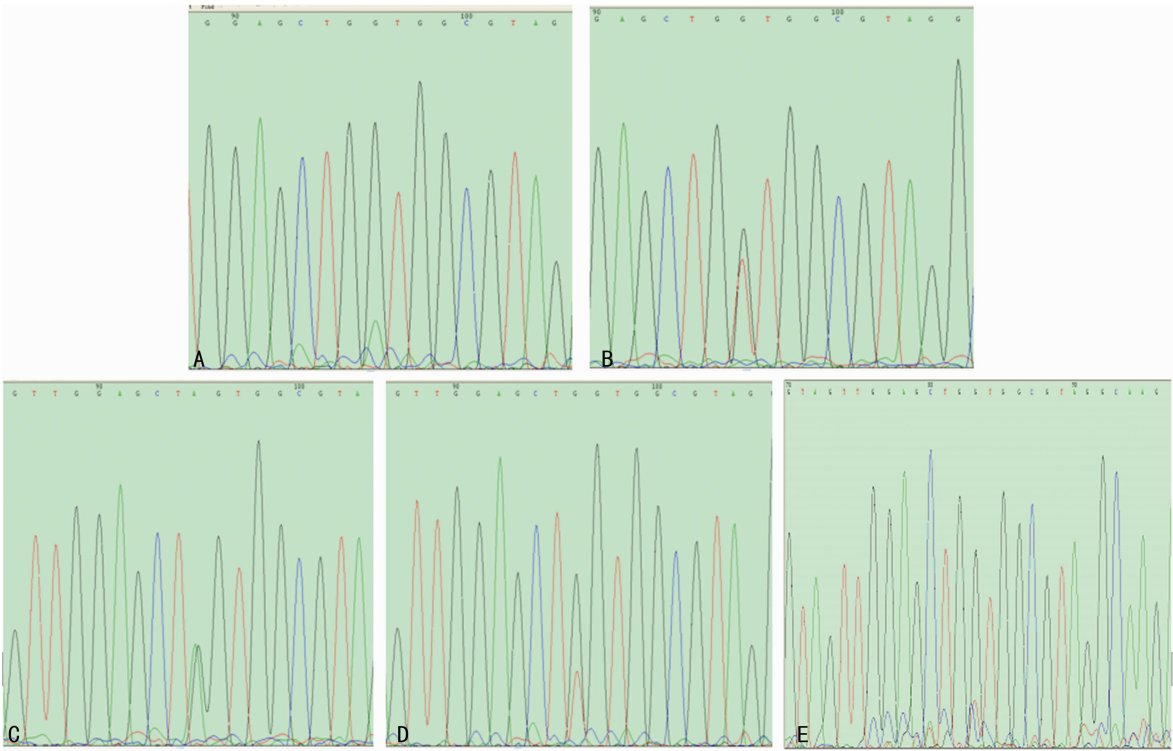


图 1 肿瘤细胞 ras 蛋白阳性图(EnVision 法,×200)

2.3 K-ras 基因突变与 ras 蛋白表达的关系 22 例 K-ras 基因突变型病例中,ras 蛋白阳性表达 13 例,阳性率为 59.1%。在 158 例 K-ras 基因野生型病例中,ras 蛋白阳性表达 37 例,阳性率为 23.4%。K-ras 基因突变型病例 ras 蛋白阳性表达率明显高于 K-ras 基因野生型病例,比较差异有统计学意义($P<0.05$)。Spearman 等级相关分析显示,ras 蛋白表达与 K-ras 基因突变呈正相关($r=0.61,P<0.05$)。



A:GGT→GAT;B:GGT→GTT;C:GGT→AGT;D:GGT→TGT;E:GGT→GCT。

图 2 K-ras 基因 12 密码子突变类型

3 讨 论

胃印戒细胞癌发病率在胃腺癌中占 3.4%~39.0%^[3-5]。它起源于黏膜固有层内腺颈部未分化的干细胞,细胞富含黏液^[6]。与其他类型腺癌比较,印戒细胞癌具有分化差、侵袭性强、进展迅速、预后差等特点,是胃腺癌中最特殊的组织病理学类型。

K-ras 基因是重要的原癌基因,编码相对分子质量为 21×10³ 的 ras 蛋白,而 ras 蛋白是 EGFR 传导通路中关键的信号分子,当 K-ras 基因突变后,ras 蛋白构象发生变化,不受上游 EGFR 信号通路的控制,不断刺激细胞无休止地分裂、增殖^[7-8]。

在实际工作中,K-ras 基因已成为结直肠癌分子靶向治疗的标靶之一,随着对胃癌基因分子分型研究的不断深入,其治疗的分子标靶逐渐成为研究的热点。基于此,本课题组前期研究即根据胃印戒细胞癌胃、肠免疫表型标记表达差异,将其分为胃型、肠型和混合型 3 个不同类型,发现这 3 个类型预后存在差异^[1]。而本研究结果显示,ras 蛋白表达和 K-ras 基因突变状态于 3 组间亦存在差异。肠型病例中 ras 蛋白阳性表达率显著高于胃型和混合型病例,这说明 ras 蛋白可能与肿瘤的胃、肠免疫表型变化存在相关性,在癌细胞表型转化过程中可能起到一定作用。Gimori 等^[9] 研究显示,ras 蛋白表达与临床病理参数之间无相关性;Atkar 等^[10] 资料表明,ras 蛋白表达程度与肿瘤的分化程度有关;Okumura 等^[11] 的结果则说明 ras 蛋白可能增强肿瘤的浸润进展、侵袭和转移能力。本研究结果显示,随着 ras 蛋白表达升高,瘤组织更易进展、浸润,且更易出现淋巴结转移,说明 ras 蛋白表达与差的肿瘤生物学行为及肿瘤演进有一定相关性,ras 蛋白可能参与肿瘤细胞浸润和扩散,在一定程度上能够反映肿瘤的生物行为。有文献报道 ras 蛋白的高表达可促进癌细胞溶解细胞外基质和胶原纤维,使细胞获得较强的浸润和转移潜能^[12],这是否能促进癌细胞的血道、淋巴道及远处转移,尚待进一步研究。

近年来研究者发现,胃腺癌中也存在一定比例 K-ras 基因突变,与胃癌发生、发展密切相关,是胃癌发生的早期事件^[13-15]。本研究显示在胃印戒细胞癌中,K-ras 基因突变率仅为 12.2%,突变率较其他胃腺癌类型偏低,且突变位点集中在 12 密码子,13 密码子未发现突变,说明在印戒细胞癌的发生发展中,K-ras 基因突变不起主导作用,突变位点较其他类型胃腺癌也存在差异。与胃型和混合型病例相比,肠型病例有较高的 K-ras 基因突变率,这表明 K-ras 基因突变对胃、肠表型变化有重要作用,证实了这种免疫表型分型存在不同的分子遗传学背景。本研究还显示,K-ras 基因突变与淋巴结转移、浸润深度、临床分期等均无显著相关性,因此进一步研究参与胃印戒细胞癌侵袭、转移的信号传导通路,阐明肿瘤的发生、发展机制,寻找新的分子治疗靶点具有十分重要的意义。

由于肠型印戒细胞癌存在较高的 ras 蛋白表达和 K-ras 基因突变率,对其个体化治疗有无价值,需要对 ras 及相关信号通路进一步研究。

参考文献

[1] 熊振芳,肖海,谭云山. 早期胃印戒细胞癌免疫表型的临床病理意义[J]. 中华病理学杂志,2010,39(7):442-446.
[2] Esteller M,Tovota M,Sanche Z,et al. Inactivation of the DNA repair gene with G to A mutations in K-ras in colorectal tumorigenesis[J]. Cancer Res,2000,60(9):2368-2371.
[3] Kwon KJ,Shim KN,Song EM,et al. Clinicopathological characteristics and prognosis of signet ring cell carcinoma of the stomach[J]. Gastric Cancer,2014,17(1):43-53.
[4] Phalanusitthepha C,Grimes KL,Ikeda H,et al. Endoscopic features of early stage signet ring cell carcinoma of the stomach[J]. World J Gastrointest Endosc,(下转第 2033 页)

- [8] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1):84.
- [9] Yu Y, Han Q, Ding X, et al. Defining core and penumbra in ischemic stroke: a voxel and volume-based analysis of whole brain CT perfusion [J]. *Sci Rep*, 2016(6):20932.
- [10] Lin L, Bivard A, Krishnamurthy V, et al. Whole-brain CT perfusion to quantify acute ischemic penumbra and core [J]. *Radiology*, 2016, 279(3):876-887.
- [11] le Feber J, Tzafi Pavlidou S, Erkamp N, et al. Progression of neuronal damage in an in vitro model of the ischemic penumbra [J]. *PLoS One*, 2016, 11(2):e0147231.
- [12] Hillis AE, Baron JC. Editorial: the ischemic penumbra: still the target for stroke therapies [J]. *Front Neurol*, 2015(6):85.
- [13] Hernandez-Morato I, Sharma S, Pitman MJ. Changes in neurotrophic factors of adult rat laryngeal muscles during nerve regeneration [J]. *Neuroscience*, 2016, 333(12):44-53.
- [14] Lian D, He D, Wu J, et al. Exogenous BDNF increases neurogenesis in the hippocampus in experimental *Streptococcus pneumoniae* meningitis [J]. *J Neuroimmunol*, 2016(294):46-55.
- [15] Tongiorgi E, Sartori A, Baj G, et al. Altered serum content of brain-derived neurotrophic factor isoforms in multiple sclerosis [J]. *J Neurol Sci*, 2012, 320(1/2):161-165.
- [16] Li X, Zheng W, Bai H, et al. Intravenous administration of adipose tissue-derived stem cells enhances nerve healing and promotes BDNF expression via the TrkB signaling in a rat stroke model [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2016(12):1287-1293.
- [17] Lau D, Bengtson CP, Buchthal B, et al. BDNF Reduces toxic extrasynaptic NMDA receptor signaling via synaptic NMDA receptors and nuclear-calcium-induced transcription of *inhba/activin A* [J]. *Cell Rep*, 2015, 12(8):1353-1366.
- [18] Wong H, Kang I, Dong XD, et al. NGF-induced mechanical sensitization of the masseter muscle is mediated through peripheral NMDA receptors [J]. *Neuroscience*, 2014(269):232-244.
- [19] Préau L, Fini JB, Morvan-Dubois G, et al. Thyroid hormone signaling during early neurogenesis and its significance as a vulnerable window for endocrine disruption [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1849(2):112-121.
- [20] Remaud S, Gothié JD, Morvan-Dubois G, et al. Thyroid hormone signaling and adult neurogenesis in mammals [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2014(5):62.
- [21] Leyhe T, Müssig K. Cognitive and affective dysfunctions in autoimmune thyroiditis [J]. *Brain Behav Immun*, 2014(41):261-266.
- [22] El-Tahry H, Marei H, Shams A, et al. The effect of triiodothyronine on maturation and differentiation of oligodendrocyte progenitor cells during remyelination following induced demyelination in male albino rat [J]. *Tissue Cell*, 2016, 48(3):242-251.
- [23] Deb I, Das S. Thyroid hormones protect astrocytes from morphine-induced apoptosis by regulating nitric oxide and pERK 1/2 pathways [J]. *Neurochem Int*, 2011, 58(8):861-871.
- [24] Kumar BK, Reddy AG, Krishna AV, et al. Developmental neurotoxicity of monocrotophos and lead is linked to thyroid disruption [J]. *Vet World*, 2016, 9(2):133-141.

(收稿日期:2016-11-26 修回日期:2017-01-12)

(上接第 2029 页)

- 2015, 7(7):741-746.
- [5] Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of gastric adenocarcinoma [J]. *Nature*, 2014, 513(7517):202-209.
- [6] Taghavi S, Jayarajan SN, Davey A, et al. Prognostic significance of signet ring gastric cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2012, 30(28):3493-3498.
- [7] Pernot S, Voron T, Perkins G, et al. Signet-ring cell carcinoma of the stomach: impact on prognosis and specific therapeutic challenge [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(40):11428-11438.
- [8] Japanese Gastric Cancer A. Japanese gastric cancer treatment guidelines 2010 [J]. *Gastric Cancer*, 2011, 14(2):113-123.
- [9] Gimori Y, Inokuchi M, Takagi Y, et al. Prognostic value of RKIP and p-ERK in gastric cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2012, 31(1):30.
- [10] Atkar SS, Durham A, Brice A, et al. Systemic activation of K-Ras rapidly induces gastric hyperplasia and metaplasia in mice [J]. *Am J Cancer Res*, 2011, 1(4):432-445.
- [11] Okumura T, Erichsen RE, Takaishi S, et al. K-Ras mutation targeted to gastric tissue progenitor cells results in chronic inflammation, an altered microenvironment, and progression to intraepithelial neoplasia [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(21):8435-8445.
- [12] Thorgeirsson UP, Turpeenniemi T, Williams JE, et al. NIH/3H3 cells transfected with human tumor DNA containing activated ras oncogenes express the metastatic phenotype in nude mice [J]. *Mol Cell Biol*, 1985, 5(1):259-263.
- [13] Takahashi N, Yamada Y, Taniguchi H, et al. Clinicopathological features and prognostic roles of KRAS, BRAF, PIK3CA and NRAS mutations in advanced gastric cancer [J]. *BMC Res Notes*, 2014, 7(1):271.
- [14] Zimmermann G, Papke B, Ismail S, et al. Small molecular inhibition of the KRAS-PDE interaction impairs oncogenic KRAS signaling [J]. *Nature*, 2013, 497(7451):638-642.
- [15] Ostrem JM, Peters U, Sos ML, et al. K-Ras (G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions [J]. *Nature*, 2013, 503(7477):548-551.

(收稿日期:2016-11-20 修回日期:2017-01-08)