

[4] 黄永梅. TP-ELISA,TPPA 和 TRUST,RPR 梅毒检测方法的比较[J]. 国际医药卫生导报,2006,12(8):88-89.

[5] 郑春苏,黄湘宁,冯彩莲. TRUST 滴度与 TPPA 联合检测在梅毒诊断中的应用[J]. 湘南学院学报:医学版,2006,8(3):67-68.

[6] 罗晓红,段朝晖,潘貽盼,等. 甲苯胺红不加热血清试验和梅毒螺旋体抗体明胶颗粒凝集试验在梅毒诊治中的应用[J]. 中国自然医学杂志,2007,9(3):219-221.

[7] 沈洪远,余伟,吴敏霞. 三种梅毒血清学试验在梅毒诊断中的应用

价值分析[J]. 临床和实验医学杂志,2008,7(1):59-60.

[8] 石玉萍,李瑞莲,王淑春. 梅毒螺旋体酶联免疫吸附试验、梅毒螺旋体被动颗粒凝集试验和快速血浆反应素试验 3 种试验方法的比较[J]. 山西医药杂志,2009,38(4):379-380.

[9] 卫生部疾病预防控制中心. 中国预防与控制梅毒规划(2010-2020 年)[S]. 2010:52.

(收稿日期:2010-10-09)

• 经验交流 •

某地区结直肠癌患者 K-Ras 基因突变检测结果分析

杨蔚蔚¹,张 玲¹,陈慧娟²,程俊峰²,胡春明²
(广州金域医学检验中心:1. 免疫室;2. 分子病理室 510030)

摘 要:**目的** 探讨广东地区结直肠癌患者组织中 K-Ras 基因突变模式,为临床治疗提供科学依据。**方法** 选取广东地区的 40 例结直肠癌患组织标本,应用聚合酶链反应以及测序法对患者 K-Ras 基因进行检测,结果采用卡方检验进行统计学分析。**结果** 在 40 例结直肠癌患者中发现 4 种 K-Ras 基因突变类型,包括密码子 12 位点 GGT→GAT、GGT→GTT、GGT→TGT 突变以及 13 位点的 GGC→GAC 突变,K-Ras 基因突变率为 35.00%。K-Ras 基因突变与年龄和性别无统计学意义。**结论** 广东地区结直肠癌患者 K-Ras 基因突变率为 35.00%(14/40)。密码子 12 位点 GGT→GAT 是突变热点,占突变的 93%,结直肠癌 K-Ras 基因突变与患者年龄及性别无关。

关键词:结直肠肿瘤; K-Ras 基因; 突变检测

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.19.057

文献标识码:B

文章编号:1673-4130(2011)19-2277-02

结直肠癌是最常见的消化道恶性肿瘤之一,近年来发病率呈上升趋势。结直肠的发生、发展是一个多阶段、多基因改变的复杂的生物学过程,包括多个癌基因的激活和抑癌基因的失活,研究表明,K-Ras 癌基因的激活与结直肠癌的发生、发展密切相关,40%的患者 K-Ras 基因发生突变^[1]。K-Ras 基因以点突变为主,突变热点位于第 2 外显子的 12、13 密码子^[2]。为探讨广东地区结直肠癌中患者组织中 K-Ras 基因突变模式以及突变特点,现采用 PCR 扩增加测序法对患者标本中 K-Ras 基因突变情况进行分析,以期为临床治疗提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集广东地区各个医院送往金域检验中心的结直肠癌患者的蜡块标本 40 例。其中结肠癌 28 例,直肠癌 12 例,男女性比例 5:3;最大年龄 70 岁,最小年龄 29 岁,平均年龄 58.5 岁。每个蜡块均由病理医师检验,其中所含肿瘤组织都超过 50%。

1.2 检测方法 应用聚合酶链反应以及测序法对患者 K-Ras 基因进行检测。主要材料与试剂 PCR 体系:2×Taq PCR MasterMix(#KT201)购自 Tiangen 公司;FFPE DNA 提取试剂盒(cat # 56404) 购自 QIAGEN,100 bp DNA Marker (DL100)购自上海天为时代有限公司;TBE 等均参考《分子克隆》附录部分配制;琼脂糖、胰酶、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、乙酸、溴化乙啶等,主要购自 Gibico 公司。PCR 产物采用直接测序,由 Invitrogen 公司完成双向测序。

1.3 统计学处理 采用 χ^2 检验进行统计。

2 结 果

2.1 40 例结直肠癌中发生突变的百分率 见表 1。

2.2 14 例结肠癌患者 K-Ras 基因各个位点的突变率 见表 2。

2.3 40 例结肠癌患者 K-Ras 基因突变与年龄的关系 见

表 3。

表 1 40 例结直肠癌中发生突变的百分率

组别	例数(n)	百分率(%)
K-Ras 基因突变组	14	35
K-Ras 基因未突变组	26	65

表 2 14 例结肠癌患者 K-Ras 基因各个位点的突变率

密码子	突变类型	氨基酸改变	例数(n)	突变率(%)
12 位点	GGT→GTT	Gly→Val	4	29(4/14)
12 位点	GGT→GAT	Gly→Asp	7	50(7/14)
12 位点	GGT→TGT	Gly→Cys	2	14(2/14)
13 位点	GGC→GAC	Gly→Asp	1	0.7(1/14)

表 3 40 例结肠癌患者 K-Ras 基因突变与年龄的关系

年龄(岁)	未突变例数 (n)	突变例数 (n)	突变检出率 (%)	χ^2 值	P 值
≤50	10	2	17	0.05	>0.05
>50	15	13	46		

2.4 40 例结肠癌患者中 K-Ras 基因突变与性别的关系 见表 4。

表 4 40 例结肠癌患者中 K-Ras 基因突变与性别的关系

性别	未突变例数 (n)	突变例数 (n)	突变检出率 (%)	χ^2 值	P 值
男性	18	7	28	2.56	>0.05
女性	7	8	53		

3 讨 论

目前,结直肠癌的治疗手段是以外科手术为主,并且随着外科技术的进步,结直肠癌远处转移灶的可切除率显著提高,患者术后的 5 年生存率也提高到 27%~41%^[3]。但靶向表皮细胞因子生长受体(如西妥昔单抗、帕尼单抗等药物)在结直肠癌治疗上的成功应用,使转移性结直肠癌的疗效更高^[4]。

K-Ras 是一种癌基因,它编码的蛋白在表皮生长因子受体(EFGR)途径中起着重要的作用。EFGR 途径是一种复杂的信号级联,它与肿瘤的发生、发展都相关^[5]。K-Ras 蛋白可以调节处于 EGFR 信号途径中下游的其他蛋白,这些蛋白与肿瘤的生存、血管生成、增殖、转移有关^[6]。目前的研究表明 K-Ras 基因在结直肠癌中发生突变的概率高于其他 Ras 基因^[7]。

K-Ras 为突变型的肿瘤,即使未被上游 EGFR 介导的信号激活,K-Ras 蛋白也是永久打开的,从而导致下游肿瘤无条理的、持续生长及扩散^[8]。最近的研究表明,通过 K-Ras 基因突变状况的分析能更好地预测某些靶向药物的疗效。

西妥昔单抗通过阻断 EGFR 的信号通路和抑制下游细胞内的信号来发挥作用,其不但能抑制肿瘤细胞的增殖,还对血管源性蛋白生成有抑制作用。西妥昔单抗也可以刺激抗体依赖细胞介导的细胞毒性(ADCC)作用,通过与已结合在肿瘤细胞表面的 IgG 抗体的 FC 段结合来侵袭并杀伤肿瘤细胞^[9]。研究表明,K-Ras 为野生型的结直肠癌患者对西妥昔单抗的效应有增强的效应,与为突变型的患者比较,K-Ras 为野生型的患者总的存活率更高^[10-14]。

结直肠癌 K-Ras 基因突变率在欧美约为 30%~68%^[15-16]。我国一些学者报道中国人约为 15%~35%^[17-18]。本研究采用 PCR 及 DNA 直接测序方法对 K-Ras 基因进行分析,结果发现 40 例结直肠癌中 14 例发生 K-Ras 基因突变,突变率为 35%,该结果与欧美的报道接近。K-Ras 基因在结直肠癌患者中有如此高的突变率,表明 K-Ras 基因突变对大肠癌的发生、发展具有重要作用。

以往报道显示中国人 K-Ras 基因突变以密码子 12 位点(GGT→GAT)多见^[15-16]。本研究共发现 4 种类型的 K-Ras 基因突变,其中密码子 12 位点(GGT→GAT)的发生率最高(50%),12 密码子(GGT→GTT)的发生率也比较高(29%)。密码子 13 位点的发生率为 7%。在 40 例患者标本中,未发现 61 位密码子发生突变的患者,表明 K-Ras 基因的 61 位密码子发生突变的频率极低。

本研究对 K-Ras 的突变与患者的性别及年龄进行了统计学分析,结果发现 K-Ras 基因突变与结直肠癌患者的性别及年龄无关($P>0.05$)。

参考文献

[1] Bazan V, Migliavacca M, Zanna I, et al. Specific codon 13 K-Ras mutations are predictive of clinical outcome in colorectal cancer patients, whereas codon 12 K-Ras mutations are associated with mucinous histotype[J]. Ann Oncol, 2002, 13(9):1438-1446.

[2] Russo A, Bazan V, Agnese V, et al. Prognostic and predictive factors in colorectal cancer: Kirsten Ras in CRC (RASCAL) and

TP53CRC collaborative studies[J]. Ann Oncol, 2005, 16 (Suppl 4):44-49.

[3] 万德森. 结直肠癌肝转移外科治疗的新概念[J]. 中华肿瘤杂志, 2008, 30(6):401-403.

[4] 徐建明. 结直肠癌分子靶向治疗面临的若干问题[J]. 中华肿瘤杂志, 2009, 31(5):312-323.

[5] Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, et al. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 1995, 19(3):183-232.

[6] Benvenuti S, Sartore-Bianche 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 Res, 2007, 67(6):2643-2648.

[7] Doolittle BR, Emanual J, Tuttle C, et al. Detection of the mutated K-Ras biomarker in colorectal carcinoma[J]. Exp Mol Pathol, 2001, 70(3):289-301.

[8] Merck. KRAS Fact Sheet[R]//Merck Serono Oncology. Patms-tadt, Germany: Merck, 2008.

[9] Kimura H, Sakai K, Arao T, et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity of cetuximab against tumor cells with wild-type or mutant epidermal growth factor receptor[J]. Cancer Sci, 2007, 98(8):1275-1280.

[10] Amo RG, Wolf M, Peeters M, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer[J]. J Clin Oncol, 2008, 26(10):1626-1634.

[11] Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al. K-Ras mutations and benefit from cetuximab in vanced colorectal cancer[J]. N Engl J Med, 2008, 359(17):1757-1765.

[12] Tabernero J, Cervantes A, Macarulla T, et al. Correlation of efficacy to KRAS status in patients with metastatic colorectal cancer, treated with weekly(q1w) and Q2w schedules of cetuximab combined with FOLFIRI[C]. ASCO GI, 2008:435-439.

[13] Lièvre A, Bachet JB, Boige V, Et Al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with vanced colorectal cancer treated with cetuximab[J]. J Clin Onc, 2008, 26(3):374-379.

[14] De Roock W, Piessevaux H, De Schutter J, et al. KRAS Mutation Status And Early Riological Response Predict Survival In Colorectal Cancer Treated With cetuximab[J]. Ann Oncol, 2008, 19(3):508-515.

[15] 袁平, 孙孟红, 张锦生, 等. 中国人大肠癌 K-Ras 基因突变的研究[J]. 临床与实验病理学杂志, 2000, 16:464-466.

[16] 于月波, 蔡心涵, 郑树. 结直肠癌患者粪便及组织中 K-Ras 基因突变的研究[J]. 浙江医科大学学报, 1995, 24(6):241-247.

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

[18] Doolittle BR, Emanuel J, Tuttle C, et al. Detection of the mutated K-Ras biomarker in colorectal carcinoma[J]. Exp Mol Pathol, 2001, 70(3):289-301.

(收稿日期:2010-10-09)