

江苏地区肺癌和胃癌患者 KRAS 基因突变状态分析*

谢玲 郑燕影 孙怡 陈劼 申龙树

摘要 目的:检测江苏地区肺癌和胃癌患者 KRAS 基因突变状态及其与临床病理特征的关系,并比较其在两种癌症间的异同。**方法:**收集肺癌 128 例,胃癌 115 例。采用直接测序法检测 KRAS 基因第 2 号外显子突变,分析基因突变状态及其与临床病理特征的相关性。**结果:**KRAS 基因突变率在肺癌和胃癌中无显著性差异(6.3% vs. 4.3%, $P>0.05$)。两种癌症中, KRAS 基因突变都以第 12 密码子为主。KRAS 突变与年龄,性别无明显相关。肺腺癌患者 KRAS 基因突变高于非腺癌包括鳞癌等(10.7% vs. 0, $P<0.05$)。**结论:**江苏地区肺癌和胃癌患者中, KRAS 第 2 外显子突变率均较低,男性和女性的突变率无明显差异。肺腺癌患者 KRAS 基因突变率相对较高,因此个体化治疗前应同时检测 KRAS 基因,以筛选出对靶向治疗耐药的肺癌患者,从而更好地指导患者的个体化分子靶向治疗。

关键词 KRAS 基因 肺癌 胃癌

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2015.21.736

KRAS gene mutations in lung and gastric cancers in Jiangsu Province

Ling XIE, Yanying ZHENG, Yi SUN, Jie CHEN, Longshu SHEN

Correspondence to: Longshu SHEN; E-mail: 11559696@qq.com

Department of Pathology, The Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

This work was supported by the Funds of Disciplinary Building-up Project of High Scholarship and Creative Research Potential in Jiangsu Colleges and Universities (No. 01206 2003010).

Abstract Objective: To investigate the KRAS gene mutation features in lung and gastric cancers and their relationship with clinicopathologic characteristics. **Methods:** A total of 128 lung cancer and 115 gastric cancer patients were included. Polymerase chain reaction amplification and DNA sequencing were conducted to detect mutations in exon 2 of the KRAS gene. **Results:** The mutation frequency of KRAS was different in lung and gastric cancers; however, it did not show any statistical significance (6.3% vs. 4.3%, $P>0.05$). The KRAS codon 12 gene mutation ranks the first in both types of cancer. No significant correlation was observed between the prevalence of KRAS mutations and patient's age and gender. KRAS gene mutation rate was higher in lung adenocarcinoma than in non-adenocarcinoma, such as squamous cancer (10.7% vs. 0%, $P<0.05$). **Conclusion:** No correlation was found between the KRAS gene mutation and the sex and age of lung and gastric cancer patients in Jiangsu Province. The rate of KRAS mutation was low. KRAS gene mutation rate was relatively higher in lung adenocarcinoma patients; thus, the mutation status of the KRAS gene should be evaluated before undergoing EGFR-TKI therapy.

Keywords: KRAS gene, lung cancer, gastric cancer

根据 GLOBOCAN 公布的全球癌症发病数据, 2012 年全球约有 1 410 万新发癌症病例, 820 万患者死于癌症。世界范围内发病最常见癌症依次为肺癌、乳腺癌和结直肠癌; 死亡率最高为肺癌、肝癌和胃癌^[1]。在我国肺癌和胃癌极为常见, 是发病率很高的恶性肿瘤。肺癌是目前全世界发病率与死亡率最高的恶性肿瘤, 其中非小细胞肺癌(NSCLC)占 80%~85%^[2]。胃癌在我国癌症发病率和死亡率中均位列第 3 位^[3]。

RAS 基因是第一个被鉴定的人类原癌基因, RAS 基因突变是最常见的癌基因异常, 大约可见于 30% 的人体肿瘤。其家族的 3 个主要成员是 HRAS、KRAS 和 NRAS, 其中 KRAS 基因突变最常见^[4]。KRAS 基因是 EGFR 信号通路下游的重要癌基因, 在细胞生长及血管生成等相关的信号转导通路中起着关键作用。野生型 KRAS 基因在上游 EGFR 信号刺激下通过信号转导发挥作用, 当 KRAS 基因发生突变时, 可不依赖其上游的 EGFR 发生自身磷酸化而

作者单位: 南京中医药大学附属医院病理科 (南京市 210029)

*本文课题受江苏省高校优势学科建设工程基金项目(编号:012062003010)资助

通信作者: 申龙树 11559696@qq.com

持续处于激活状态,这种激活是不可控的,并导致肿瘤的增殖和播散。因此突变型KRAS基因患者使用抗EGFR药物治疗无效^[5-8]。KRAS基因最常见突变发生在第2号外显子的第12和13位密码子(85%~95%),其他突变位点包括第3号外显子的第61和146位密码子(约5%),检测这些突变有重要的诊断及治疗意义。美国NCCN临床实践指南明确指出:RAS基因发生突变的癌症患者不建议使用分子靶向药物如西妥昔单抗、吉非替尼治疗等。本研究用测序法检测肺癌和胃癌中KRAS基因第2外显子的突变发生率、突变特征及其与临床病理特征的关系,并比较基因突变在两种癌症间的异同。

1 材料与方法

1.1 标本

收集2006年12月至2014年12月南京中医药大学附属医院病理科及外院会诊肺癌病例128例,胃癌115例。128例肺癌病例中,男性76例、女性52例,男女比例为1.5:1;年龄为29~86岁,平均年龄为60.2岁。其中19例患者25~44岁,45例患者45~59岁,64例患者60~90岁。组织学证实腺癌75例,鳞癌30例,其他类型肺癌23例。115例胃癌病例中男性76例、女性39例,男女比例为1.9:1。年龄为24~89岁,平均年龄61.1岁。其中13例患者25~44岁,43例患者45~59岁,59例患者60~90岁。组织学证实肠型胃癌90例,弥漫型胃癌25例。所有标本均为甲醛固定、石蜡包埋组织,所有病例均行KRAS基因第2号外显子突变检测。本研究经医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 基因组DNA抽提 所有蜡块常规切片4 μm厚5~10张,显微镜下观察HE切片,选取富于肿瘤细胞的区域,对应H&E切片将肿瘤组织刮入裂解液,保证肿瘤成分50%以上。按照组织DNA提取试剂盒(美国OMEGA)说明书操作提取组织DNA。

1.2.2 PCR法扩增KRAS基因第2号外显子 根据NCBI提供的KRAS基因DNA序列设计PCR引物,并由上海生工公司合成。序列如下:上游引物为AGG CCTGCTGAAAATGACTG;下游引物为:CATGAAAA TGGTGAGAGAAACC。PCR反应体系20 μL:10×PCR Buffer 2 μL, HotStar Taq DNA Polymerase(德国QIAGEN公司)0.2 μL, Mg²⁺-Solution 0.75 μL, dNTP 2 μL, Primer各1 μL,模板DNA 1 μL,去离子水12 μL。PCR反应条件:置ABI-9700型扩增仪中,95℃预变性15 min,

94℃变性50 s,57℃退火1 min,72℃延伸1 min,共循环35次,最后于72℃延伸10 min。以双蒸水代替DNA模板作为阴性对照,以已知阳性病例作为阳性对照。

1.2.3 DNA测序 将PCR产物进行过柱纯化(美国Axygen公司),然后用PCR纯化产物进行测序PCR反应及纯化后,上样至ABI 3100-Avant遗传分析仪进行测序。

1.3 统计学方法

采用SPSS 18.0统计软件,对不同组别的突变率行 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 肺癌患者KRAS基因突变与临床病理特征的相关性

肺癌患者KRAS基因突变率为6.3%(8/128),其中6例为第12密码子突变,占75%(6/8);2例为第13密码子突变,占25%(2/8)。第12密码子中G12D(GGT>GAT)4例,G12V(GGT>GTT)1例,G12C(GGT>TGT)1例;第13密码子中G13D(GGC>GAC)2例。KRAS基因突变类型及其与病理类型、性别、年龄的关系见表1。128例肺癌中,肺腺癌患者KRAS基因突变为10.7%(8/75),高于非腺癌患者包括鳞癌等($P<0.05$)。肺癌男性患者KRAS突变率为6.6%(5/76),略高于女性患者5.7%(3/52),但差异无统计学意义($P>0.05$)。KRAS基因在25~44岁患者中突变率为10.5%(2/19),高于45~59岁患者的6.7%(3/45)及60~90岁患者的4.7%(3/64),但差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 胃癌患者KRAS基因突变特征及其与临床病理的相关性

胃癌患者KRAS基因突变率为4.3%(5/115),其中4例为第12密码子突变,占80%(4/5);1例为第13密码子突变,占20%(1/5)。第12密码子中G12D(GGT>GAT)3例,G12V(GGT>GTT)1例;第13密码子中G13D(GGC>GAC)1例。KRAS基因突变类型及其与病理类型、性别、年龄的关系见表2。115例胃癌中,弥漫型胃癌KRAS基因突变率为8.0%(2/25),高于肠型胃癌的3.3%(3/90),但差异无统计学意义($P>0.05$)。胃癌患者男性和女性KRAS突变率差异无统计学意义($P>0.05$)。KRAS基因在25~44岁患者中突变率为7.7%(1/13),高于45~59岁的4.6%(2/43)及60~90岁患者的3.4%(2/59),但差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 128 例肺癌中 KRAS 基因突变类型分布及其与性别、年龄、病理类型的关系

Table 1 Mutation frequencies of KRAS gene and their relationship with pathological types, gender, and age of lung cancer patients

K-ras mutation	Amino acid change	Mutation frequency							
		Pathological types			Gender		Age (years)		
		Adenocarcinoma n=75	Squamous carcinoma n=30	Others n=23	Male n=76	Female n=52	25-44 n=19	45-59 n=45	60-90 n=64
G12D	GGT>GAT	4 (5.3)	-	-	2 (2.6)	2 (3.8)	1 (5.3)	2 (4.4)	1 (1.6)
G12V	GGT>GTT	1 (1.3)	-	-	-	1 (1.9)	-	-	1 (1.6)
G12C	GGT>TGT	1 (1.3)	-	-	1 (1.3)	-	1 (5.3)	-	-
G12S	GGT>AGT	-	-	-	-	-	-	-	-
G12R	GGT>CGT	-	-	-	-	-	-	-	-
G12A	GGT>GCT	-	-	-	-	-	-	-	-
G13D	GGC>GAC	2 (2.7)	-	-	2 (2.6)	-	-	1 (2.2)	1 (1.6)
G13C	GGC>TGC	-	-	-	-	-	-	-	-
G13A	GGC>GCC	-	-	-	-	-	-	-	-
G13V	GGC>GTC	-	-	-	-	-	-	-	-
Total (%)		10.7	0	0	6.6	5.7	10.5	6.7	4.7

表 2 115 例胃癌中 KRAS 基因突变类型分布及其与性别、年龄、病理类型的关系

Table 2 Mutation frequencies of KRAS gene and their relationship with pathological types, gender, and age of gastric cancer patients

K-ras mutation	Amino acid change	Mutation frequency							
		Pathological types			Gender		Age (years)		
		Intestinal type n=90	Diffuse type n=25	Others n=0	Male n=76	Female n=39	25-44 n=13	45-59 n=43	60-90 n=59
G12D	GGT>GAT	1 (1.1)	2 (8.0)	-	2 (2.6)	1 (2.6)	1 (7.7)	1 (2.3)	2 (3.4)
G12V	GGT>GTT	1 (1.1)	-	-	1 (1.3)	-	-	-	-
G12C	GGT>TGT	-	-	-	-	-	-	-	-
G12S	GGT>AGT	-	-	-	-	-	-	-	-
G12R	GGT>CGT	-	-	-	-	-	-	-	-
G12A	GGT>GCT	-	-	-	-	-	-	-	-
G13D	GGC>GAC	1 (1.1)	-	-	-	1 (2.6)	-	1 (2.3)	-
G13C	GGC>TGC	-	-	-	-	-	-	-	-
G13A	GGC>GCC	-	-	-	-	-	-	-	-
G13V	GGC>GTC	-	-	-	-	-	-	-	-
Total (%)		3.3	8	0	3.9	5.1	7.7	4.6	3.4

3 讨论

分子靶向药物的研发和个体化医学的发展使肿瘤治疗进入了分子靶向治疗的新时期。目前,靶向 EGFR 的酪氨酸激酶抑制剂(EGFR-TKIs)已广泛应用于临床治疗 NSCLC。研究表明,EGFR 基因突变与 TKIs 敏感性相关,编码 EGFR 下游 GTP 酶的 KRAS 基因突变则是 NSCLC 患者耐药的主要原因^[5-7]。KRAS 基因的突变可以引起 EGFR 信号通路的配体非依赖性持续性激活,进而导致 EGFR-TKI 原发性耐药。因此检测 KRAS 基因突变可能有助于选择最适宜患者接受 TKI 治疗,也是判断 NSCLC 患者预后的一项重要指标。抗 EGFR 单克隆抗体(西妥昔单抗、

帕尼单抗等)用于靶向治疗转移性结直肠癌者。RAS 基因突变的结直肠癌患者不能从抗 EGFR 治疗中获益,反而徒增不良反应危险和治疗费用,而 KRAS 基因野生型患者就很有可能从这类药物治疗中获益^[8-9]。遗憾的是,应用 EGFR 分子靶向药物治疗胃癌的情形可能有别于结肠癌和肺癌,相关的临床研究不多,针对胃癌 KRAS 基因突变与 EGFR 分子靶向药物疗效的研究也较少。有研究表明,西妥昔单抗联合化疗治疗晚期胃癌有良好的疗效^[10]。一项联合应用西妥昔单抗与 FOLFIRI 方案的近期研究发现,KRAS 野生型,EGFR 阳性表达的胃癌细胞株对西妥昔单抗治疗敏感^[11]。

西方国家 NSCLC 患者人群中 KRAS 基因突变率较高,非小细胞肺癌突变率为 20%~30%,其中腺癌的突变率为 22%~34%,鳞癌为 0~25%,大细胞肺癌为 8%~33%,腺鳞癌为 8%~11%,但 EGFR 基因的突变率低,仅为 3%~8%;亚洲国家 NSCLC 患者则相反,EGFR 基因的突变率为 30%~60%,KRAS 基因的突变率为 4%~24%^[12-15]。KRAS 基因突变在非亚洲人群、吸烟者以及黏液性腺癌中最为常见。NSCLC 患者 KRAS 基因突变主要发生于第 2 外显子的 12 和 13 号密码子,其中第 12 密码子的突变为 80%~96%,第 13 密码子的突变为 5%~12%^[15]。本研究中,检测了 128 例肺癌病例中 KRAS 基因第 2 号外显子突变,突变率为 6.3%(8/128)。这与先前报道的白种人腺癌患者 KRAS 基因较高突变率明显不相符合,但却与亚裔患者 KRAS 基因突变率相近。造成这种差异的原因很可能与种族相关,对此尚需要进一步研究证实。本研究结果显示,KRAS 基因突变类型主要为 G12D(GGT>GAT),突变率均为 3.1%(4/128);在 8 例 KRAS 基因突变病例中,主要为 12 密码子突变,共有 6 例(75%),另外 2 例为 13 密码子突变(25%),与相关文献报道结果一致。据报道,男性患者 KRAS 基因突变率比女性明显高,腺癌患者比鳞癌患者显著增高^[16]。本研究中,同样发现肺腺癌患者的突变率明显高于非腺癌患者包括鳞癌等($P<0.05$),男性患者的 KRAS 基因突变率略高于女性,25~44 岁患者突变率高于 45~59 岁及 60~90 岁患者,但差异无统计学意义。

RAS 基因突变与胃癌发生发展相关,在胃腺癌中 KRAS 基因突变率为 0~28%,并且不同地区有着不同的发生率,日本为 0~13%,韩国为 2.8~9.0%,意大利为 8~21%,美国、荷兰等地区的发生率均不足 4%^[17]。我国胃癌 KRAS 基因突变率为 0~10.3%^[18]。本研究结果为 4.3%(5/115),在 5 例 KRAS 基因突变病例中,主要为第 12 密码子突变,共有 4 例(80%),另外 1 例为第 13 密码子突变(20%),与亚洲地区结果类似。根据文献报道,KRAS 基因突变与 HP 感染,胃癌肝转移相关,肠型胃癌中 KRAS 基因突变发生率高于弥漫型胃癌。但本结果显示弥漫型胃癌 KRAS 基因突变率为 8.0%(2/25),高于肠型胃癌的 3.3%(3/90),但差异无统计学意义($P>0.05$)。由于弥漫型胃癌有较高的 KRAS 基因突变率,该基因突变对其个体化治疗有无价值,值得做更进一步的研究。鉴于本研究病例数量较少,未来尚需要扩大病例数进行研究。有关胃癌组织中 KRAS 基因状态研究较少,但已有的

研究表明,总体突变率不高,其对 EGFR 靶向治疗胃癌的影响仍有待阐明,需要进一步的研究以寻找更有效的生物标记物。

本研究中,KRAS 基因突变率在肺癌和胃癌中均较低,二者差异无统计学意义。文献报道肠癌患者 KRAS 基因突变率为 30%~40%,明显高于肺癌和胃癌患者^[19]。目前,肿瘤组织 RAS 基因突变作为西妥昔单抗在转移性结直肠癌患者中疗效的预测指标已经成为共识。虽然亚洲人群肺癌患者 KRAS 基因突变率较低,但是肺腺癌患者突变率明显高于非腺癌患者,因此临床肺腺癌患者在应用靶向药物之前也应重视 KRAS 基因突变的检测,从而更好地指导患者的个体化分子靶向治疗。肺癌和胃癌二种肿瘤中,KRAS 基因突变都以第 12 密码子为主,并未见 KRAS 突变与年龄、性别相关,KRAS 基因突变与临床病理特征之间的关系尚需更多的研究来确定。

参考文献

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65:87-108.
- [2] Custodio A, Mendez M, Provencio M. Targeted therapies for advanced non-small-cell lung cancer:current status and future implications[J]. Cancer Treat Rev, 2012, 38(1):36-53.
- [3] Chen WQ, Zheng RS, Zeng HM, et al. Report of cancer incidence and mortality in China, 2011[J]. China Cancer, 2015, 24(1): 1-10.[陈万青,郑荣寿,曾红梅,等.2011 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J].中国肿瘤,2015,24(1):1-10.]
- [4] Lowy DR, Willumsen BM. Function and regulation of ras [J]. Annu Rev Biochem, 1993, 62:851-891.
- [5] Zhou C, Wu YL, Chen G, et al. Erlotinib versus chemotherapy as first line treatment for patients with advanced EGFR positive non-small cell lung cancer (OPTIMAL CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study[J]. Lancet Oncol, 2011, 12(8): 735-742.
- [6] Mao C, Qiu LX, Liao RY, et al. KRAS mutations and resistance to EGFR-TKIs treatment in patients with non-small cell lung cancer: a meta-analysis of 22 studies[J]. Lung Cancer, 2010, 69(2):272-278.
- [7] Martin PI, Leigh NB, Tsao MS, et al. KRAS mutations as prognostic and predictive markers in non-small cell lung cancer[J]. Thorac Oncol, 2013, 8(5):530-542.
- [8] Karapetis CS, Khambata-Ford, Janker DJ, et al. K-ras mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab[J]. J Clin Oncol, 2008, 26:374-379.
- [9] Christos S, Karapetis, Khambata-Ford S, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer[J]. N Engl J Med, 2008, 359(17):1757-1765.
- [10] Lordick F, Luber B, Lorenzen S, et al. Cetuximab plus oxaliplatin/eucovorin/5-fluorouracil in first-line metastatic gastric cancer:a phase II study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (AIO)[J]. Br J Cancer, 2010, 102(3):500-505.

[11] Hotz B, Keilholz U, Fusi A, et al. In vitro and in vivo antitumor activity of cetuximab in human gastric cancer celllines in relation to epidermal growth factor receptor (EGFR) expression and mutational phenotype[J]. Gastric Cancer, 2012, 15(3):252-264.

[12] Aviel-Ronen S, Blackhall FH, Shepherd FA, et al. K-ras mutations in non-small-cell lung carcinoma: a review[J]. Clinical Lung Cancer, 2006, 8(1):30-38.

[13] Marks JL, Broderick S, Zhou Q, et al. Prognostic and therapeutic implications of EGFR and KRAS mutations in resected lung adenocarcinoma[J]. J Thorac Oncol, 2008, 3(2):111-116.

[14] Wu CC, Hsu HY, Liu HP, et al. Reversed mutation rates of KRAS and EGFR genes in adenocarcinoma of the lung in Taiwan and their implications[J]. Cancer, 2008, 113(11):3199-3208.

[15] Gao B, Sun Y, Zhang J, et al. Spectrum of L858R, EGFR, and KRAS mutation in Chinese lung adenocarcinomas[J]. J Thorac Oncol, 2010, 5(8):1130-1135.

[16] Sun LN, Luan HL, Zang FL, et al. Relationship between EGFR and K-ras mutations and clinicopathological characteristics and response to erlotinib treatment in 301 Chinese patients with non-small cell lung cancer[J]. Chinese Journal of Oncology, 2010, 32(9):667-670. [孙蕾娜, 栾焕玲, 臧凤琳, 等. 中国人非小细胞肺癌 EGFR 和 K-ras 基因突变与临床病理特征及厄洛替尼治疗效果的关系[J]. 中华肿瘤杂志, 2010, 32(9):667-670].

[17] vanGrieken NC, Aoyama T, Chambers PA, et al. KRAS and BRAF mutations are rare and related to DNA mismatch repair deficiency in gastric cancer from the East and the West: Results from a large international multicenter study[J]. Br J Cancer, 2013, 108(7):1495-1501

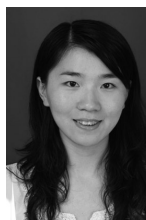
[18] Liu ZM, Liu LN, Li M, et al. Mutation detection of KRAS by high-resolution melting analysis in Chinese with gastric cancer[J]. Oncology Reports, 2009, 22(2):515-520.

[19] Neumann J, Zeindl-Eberharl E, Kirehner T, et al. Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer[J]. Pathol Res Pract, 2009, 205(12):858-862.

(2015-07-07 收稿)

(2015-09-24 修回)

(编辑:杨红欣)



作者简介

谢玲 专业方向为临床肿瘤病理及分子病理学研究。

E-mail: xl6250@163.com

• 读者 • 作者 • 编者 •

欢迎订阅《中国肿瘤临床》

《中国肿瘤临床》为中国科协主管、中国抗癌协会主办、国内外公开发行的肿瘤学专业学术期刊。秉承“引导创新、关注前沿、突出临床、讲求实用”的办刊宗旨,快速报道国内外肿瘤学领域优秀科研成果和临床诊疗经验,促进国内外肿瘤学领域学术交流,为肿瘤医学事业发展而服务。主要栏目:基础研究、临床研究与应用、特约综述、国家自然科学基金研究进展综述等。为中文核心期刊、中国科技论文统计源期刊、被 Chemical Abstracts(CA)、Biological Abstracts(BA)、《中国科学引文索引》等收录。

《中国肿瘤临床》为半月刊,全年出版 24 期,每月 15 日和 30 日出版,国内外公开发行。2016 年起国内定价 35 元/册。国内刊号:CN12-1099/R,国际刊号:ISSN 1000-8179,邮发代号:6-18,国外代号:M6690。全国各地邮局订购,也可向编辑部直接邮购。

编辑部地址:天津市河西区体院北环湖西路肿瘤医院 C 楼 3 层 邮编:300060

电话/传真:022-23527053 网址:http://www.cjco.cn

邮箱:cjcotj@sina.com;cjco@cjco.cn