

Kras、Braf 基因突变联合检测在结直肠癌中的意义与价值研究^{*}

劳景茂, 韦小波, 刘广, 邓伟[#] (广西钦州市第一人民医院, 广东广州 535000)

摘要: 目的: 对结直肠癌中联合检测 Kras、Braf 基因突变的意义和价值进行研究分析。方法: 收集在我院行结直肠癌手术患者切除标本 80 例, 对 DNA 进行提取后采用突变扩增阻滞技术检测 Kras、Braf 基因突变的状态, 并对基因突变和临床特征的相关性加以分析。结果: KRAS 基因突变率为 50.00%(40/80), BRAF 基因突变率为 5.00%(4/80), BRAF 基因突变共 4 例, 与 KRAS 存在共同突变情况; 突变最多的是 2 号外显子, 占比为 80.00% (32/40), 12 密码子 G12S/G12D 在 KRAS 基因 2 号外显子中的突变最为常见, 共 17 例, 占比为 53.13% (17/32); KRAS 基因突变合并 BRAF 的突变类型中, 2 号外显子上 G12S、G12D 的合并 BRAF 例数是最多的; 与 KRAS 基因突变率存在显著正相关的是肿瘤部位、肿瘤浸润深度; 近端结肠患者 KRAS 突变率明显高于远端结肠癌和直肠患者 ($P < 0.05$); 浸润深度为 T4 的患者 KRAS 基因突变率显著高于浸润深度为 T1~3 患者 ($P < 0.05$); BRAF 基因突变与肿瘤浸润程度、分化程度有显著相关性; 浸润深度为 T4 的患者 BRAF 基因突变率显著高于浸润深度为 T1~3 的患者 ($P < 0.05$); 低分化肿瘤患者 BRAF 基因突变率显著高于中、高分化组 ($P < 0.05$)。结论: 结直肠癌患者的 Kras 基因突变率高, 其 Braf 基因突变均与结直肠癌的发生发展之间存在相关性。

关键词: 结直肠癌; Kras 基因; Braf 基因; 突变; 价值

结直肠癌 (Colorectal Cancer, CRC) 发生于结肠和直肠中, 是一种常见的消化道恶性肿瘤。作为结直肠癌常规治疗方法之一的化疗已经遇到了一定的困境和瓶颈, 且越晚治疗预后越差, 但是结直肠癌目前还没有确切的肿瘤标志物来进行早筛, 肠镜筛查又因为耐受性问题而无法普及, 因此找到结直肠癌的肿瘤标志物已经成为了医学界广泛关注的研究热点之一。近年来, 有研究发现, 某些基因突变是导致结直肠癌发生、发展的根本原因, 认为 KRAS 和 BRAF 基因突变与抗 EGFR 靶向治疗之间的效果存在紧密相关性, 抗 EGFR 靶向治疗得到较好效果的患者大部分是 KRAS 和 BRAF 基因野生型^[1~3]。基于此, 本研究对结直肠癌中联合检测 Kras、Braf 基因突变的意义和价值进行研究分析。

1 一般资料和方法

1.1 一般资料

收集 2018 年 9 月~2021 年 9 月在我院行结直肠癌手术患者切除标本 80 例, 其中男 56 例、女 24 例, 年龄 34~78 岁, 平均 (63.24 ± 10.34) 岁。所收集的标本均经病理学检验确诊, 且资料完整。

1.2 试剂与仪器

采购自厦门艾德的试剂盒, 包含了石蜡包埋组织 DNA 提取试剂盒及人类 KRAS/ BRAF 基因突变检测试剂盒; 采购自美国 Thermo fisher scientific 公司的 Thermo Nano Drop 2000c 超微量紫外分光光度计; 采购自德国安捷伦的 Mx3 000P 荧光定量 PCR 仪。

1.3 方法

1.3.1 石蜡切片样品病理评估

对组织样本进行连续切片。选择一块较为清晰的组织切面进行观察, 利用苏木精和伊红试剂进行染色和评估, 将切片放在显微镜下, 用不同倍数进行观察。

以低倍镜视野下对该切片的观察情况作为标准进行分析, 标记还没有肿瘤侵犯部分出现的部分; 细胞计数可以在高倍镜视野下完成, 原则上要对每个标本中的五个视野左、右、中、上、下加以保证。然后在每个视野中对 30 个完整细胞加以连续计数, 取其中的总和和平均数, 如果平均肿瘤细胞达到超 10% 百分之十, 则表示病理学承认该样本可用。

1.3.2 石蜡切片组织基因 DNA 提取

对样品进行苏木精 - 伊红的染色。从其余切

^{*} 基金项目: 广西壮族自治区卫计委自筹经费科研课题 (项目编号: Z 20210329)。

[#] 通信作者: 邓伟, lao159770222882@163.com。

片中刮取肿瘤组织，放入 1.5 ml 的 EP 试管中，进行常规的脱蜡处理后，再采用手工 - 柱提取法严格按照提取盒的说明进行操作。用紫外分光光度计对所提取的 DNA 进行纯度和浓度的检测，所需达到的要求为 1.8~2.0 之间的纯度 A280/A260 比值，使浓度达到 3.0 ng/μl。

1.3.3 突变扩增阻滞系统技术 (Amplification Refractory Mutation System, ARMS)-PCR 反应

操作过程严格按照 KRAS/NRAS/BRAF/PIK3CA 基因突变检测试剂盒说明书中的内容进行。

PCR 反应参数如下：95℃ 5 min，1 个循环；95℃ 25 s，64℃ 20 s，72℃ 20 s，15 个循环；93℃ 25 s，60℃ 35 s，72℃ 20 s，31 个循环。

在第三阶段操作进行到 60℃ 时对羟基荧光素 (FAM) 和 5- 六氯荧光素氨基磷酸酯 (HEX) 通道信号加以收集，判读和分析遵循试剂盒说明书的判读原则，并分析结果。每次反应都对阳性和阴性对照加以设置以确保结构准确度。

1.4 统计学处理方法

数据处理采用 SPSS23.0 统计学软件，计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，采用 t 检验，计数资料用比率表示，采用 χ^2 检验， $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 KRAS、BRAF 基因突变情况

KRAS 基因突变率为 50.00%(40/80)，BRAF 基因突变率为 5.00%(4/80)，BRAF 基因突变共 4 例，与 KRAS 存在共同突变情况。见表 1。

基因名称	检测区段	突变例数 (例)	突变率 (%)	合计
KRAS	2 号外显子	32	40.00%	50.00% (40/80)
	3 号外显子	3	3.75%	
	4 号外显子	5	6.25%	
BRAF	15 号外显子	4	5.00%	5.00% (4/80)

2.2 KRAS 基因突变类型和频率

突变最多的是 2 号外显子，占突变的 80.00% (32/40)，12 密码子 G12S/G12D 在 KRAS 基因 2 号外显子中的突变最为常见，有 17 例，占

53.13% (17/32)。KRAS 基因突变合并 BRAF 的突变类型中，2 号外显子上的 G12S,G12D 的合并 BRAF 的例数是最多的。见表 2。

检测区段	突变类型	例数 (例)	合并 BRAF (例)
2 号外显子	G12S,G12D	17	4
2 号外显子	G12C,G12R,G12V, G12A,G13C	10	1
2 号外显子	G13D	5	1
3 号外显子	Q61L,Q61R,Q61H	3	0
4 号外显子	K117N,A146T,A146V, A146P	5	0

2.3 KRAS、BRAF 基因突变情况与临床病理特征的关系

与 KRAS 基因突变率存在正相关是肿瘤部位、肿瘤浸润深度，近端结肠患者的 KRAS 突变率明显高于远端结肠癌和直肠患者 ($P < 0.05$)。在浸润深度为 T4 的患者中，KRAS 基因突变率显著高于浸润深度为 T1~3 的患者 ($P < 0.05$)；BRAF 基因突变与肿瘤浸润程度、分化程度有显著相关性；在浸润深度为 T4 的患者中，BRAF 基因突变率显著高于浸润深度为 T1~3 的患者 ($P < 0.05$)。在低分化肿瘤患者中，BRAF 基因突变率显著高于中、高分化组 ($P < 0.05$)。见表 3。

项目	n=80	KRAS		BRAF	
		突变	P	突变	P
年龄	> 60 岁	46	21	2	
	≤ 60 岁	34	19	0.054	2 0.078
性别	男	50	25		3
	女	30	15	0.067	1 0.088
神经束侵犯	有	15	7		1
	无	65	33	0.054	3 0.06
脉管癌栓	有	25	15		1
	无	55	35	0.076	3 0.065
肿瘤大小	≥ 5 cm	30	15		1
	< 5 cm	50	25	0.08	2 0.056
临床分期	I 期	8	4		1
	II 期	30	15		1
	III 期	16	7		1
	IV 期	26	14	0.067	1 0.1

表3 KRAS、BRAF 基因突变情况与临床病理特征的关系(例)

肿瘤浸润深度	T1~2	14	2		0	
	T3	42	19		1	
	T4	24	20	0.032	3	0.023
淋巴结转移	N0	34	16		2	
	N1	24	12		1	
	N2	22	12	0.787	1	0.768
分化程度	高分化	4	2		0	
	中分化	64	30		1	
	低分化	12	8	0.878	3	0.023
根治程度	根治	60	28		3	
	姑息	20	12	0.687	1	0.576
	近端结肠	20	17		2	
肿瘤部位	远端结肠	34	17		1	
	直肠	24	6	0.023	1	0.078

3 讨论

Kras 是一种鼠类肉瘤病毒癌基因, ras 基因家族与人类肿瘤相关的基因有 3 种, 即 H-ras、K-ras 和 N-ras, 分别定位在 11、12 和 1 号染色体上。K-ras 因编码 21kD 的 ras 蛋白又名 p21 基因。在 ras 基因中, K-Ras 对人类癌症影响最大, 它好像分子开关, 当正常时能控制调控细胞生长的路径; 发生异常时, 则导致细胞持续生长, 并阻止细胞自我毁灭; 它参与细胞内的信号传递, 当 K-ras 基因突变时, 该基因永久活化, 不能产生正常的 ras 蛋白, 使细胞内信号传导紊乱, 细胞增殖失控而癌变^[4]。

本研究发现, KRAS 基因突变率为 50.00%(40/80), BRAF 基因突变率为 5.00%(4/80), BRAF 基因突变共 4 例, 与 KRAS 存在共同突

变情况; 与 KRAS 基因突变率存在正相关的是肿瘤部位、肿瘤浸润深度呈现; 近端结肠患者 KRAS 突变率明显高于远端结肠癌和直肠患者 ($P < 0.05$); 浸润深度为 T4 的患者 KRAS 基因突变率显著高于浸润深度为 T1~3 的患者 ($P < 0.05$)。

NRAS 基因是 RAS 基因家族的一员, 其编码的 N-ras 蛋白在 RAS-RAF-MEK-ERK 通路中扮演着非常重要的角色, 主要是负责整个细胞循环周期和基因转录活动, 和细胞增殖有着密切的关系, 该基因一旦发生致病性突变就会引起细胞增殖失控, 从而形成肿瘤^[5]。本研究发现, BRAF 基因突变与肿瘤浸润程度、分化程度显著相关性; 浸润深度为 T4 的患者 BRAF 基因突变率显著高于浸润深度为 T1~3 的患者 ($P < 0.05$); 低分化肿瘤患者 BRAF 基因突变率显著高于中、高分化组 ($P < 0.05$)。

综上, 结直肠癌患者 Kras 基因突变率高, 其 BraF 基因突变均与结直肠癌的发生发展之间存在相关性。

参考文献

- [1] 郑荣寿, 孙可欣, 张思维, 等. 2015 年中国恶性肿瘤流行情况分析 [J]. 中华肿瘤杂志, 2019, 41(1): 19-28.
- [2] 刘晓娜, 田庄, 魏晓飞, 等. 联合检测结直肠癌患者血浆及组织中 KRAS、NRAS、BRAF 及 PIK3CA 基因突变情况 [J]. 中华病理学杂志, 2019, 48(5): 373-377.
- [3] 刘梅, 张维, 张国龙, 等. KRAS 基因检测与西妥昔单抗一线治疗转移性结直肠癌的成本-效用分析 [J]. 中国新药杂志, 2018, 27(24): 2969-2976.
- [4] 张莹, 王哲, 杨向红. 结直肠癌患者应用 ARMS 法检测 KRAS、NRAS、PIK3CA、BRAF 基因突变分析 [J]. 诊断病理学杂志, 2019, 26(8): 506-511.
- [5] Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.