

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.01.010

K-ras 基因型与直肠癌术前放化疗后肿瘤病理消退的相关性研究

王伟¹, 丁喆²

(宁夏医科大学 1. 临床医学院肿瘤学系; 2. 总医院放疗科, 银川 750004)

【摘要】目的: 探讨 K-ras 基因突变是否可作为直肠癌术前放化疗后肿瘤组织病理消退的预测因子。方法: 收集我院行术前放化疗的Ⅱ、Ⅲ期直肠癌患者 46 例, 通过放化疗前活检石蜡包埋组织获取 DNA 样本, 经 PCR 扩增后测序, 明确 K-ras 基因第 12、13 密码子突变情况。根据 Dwork's 直肠癌肿瘤消退分级标准评定放化疗后肿瘤组织的病理改变, 将 TRG2+3+4 定义为肿瘤组织消退良好, TRG0+1 肿瘤组织无明显消退。结果: 46 例患者中成功提取 DNA 43 例, K-ras 基因突变 15 例 (34.9%), 其中第 12 密码子突变 11 例 (73.3%), 第 13 密码子突变 4 例 (26.7%)。43 例患者中 TRG2+3+4 者 29 例 (67.4%), TRG0+1 者 14 例 (32.6%)。K-ras 基因突变组和野生组肿瘤组织消退良好者分别为 66.7% 和 67.8%, 2 组相比差异无统计学意义 ($P=0.793$)。结论: 在 K-ras 基因突变型和野生型的直肠癌患者中, 术前放化疗后直肠肿瘤病理消退程度无差异, K-ras 基因突变不能作为直肠癌术前放化疗后肿瘤组织病理消退的预测因子。

【关键词】 直肠肿瘤; 术前放化疗; K-ras

【中国图书分类法分类号】 R735.3

【文献标志码】 A

【收稿日期】 2011-07-21

Correlation between K-ras genotype with tumor regression of rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy

WANG Wei¹, DING Zhe²

(1. Department of Oncology, Institute of Clinical Medicine; 2. Department of Radiation Oncology, the General Hospital, Ningxia Medical University)

【Abstract】Objective: To evaluate whether the presence of K-ras gene mutations is a useful tumor-response marker in patients with locally advanced rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. **Methods:** 46 patients with locally advanced rectal cancer who were treated with preoperative chemoradiotherapy were enrolled. DNA was isolated from paraffin-embedded tissues before chemoradiotherapy amplified by PCR, and then sequenced in order to detect K-ras mutations in codons 12, 13. Post-operative specimens were classified according to the Dwork's tumor regression grading (TRG). Good tumor regression was defined as TRG 2+3+4, insignificant tumor regression as TRG 0+1. **Results:** DNA was successfully extracted from 43 patients, K-ras mutation occurred in 15 patients (34.9%), of which mutation in codon 12 occurred in 11 patients (73.3%), and mutation in codon 13 occurred in 4 patients (26.7%). 29 (67.4%) patients were graded as TRG 2+3+4, 14 (32.6%) as TRG 0+1. Pathologic response rates in K-ras gene mutation group and wild group were 66.7% and 67.8%, respectively, with no significant difference between two groups ($P=0.793$). **Conclusions:** There is no difference in the degree of tumor pathological regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer in the different K-ras genotypes, K-ras mutation status does not predict response to preoperative chemoradiotherapy.

【Key words】 rectal cancer; preoperative chemoradiotherapy; K-ras

术前放射治疗联合以 5-FU 为基础的化疗已成为中下段进展期直肠癌的标准治疗方式之一。然而, 肿瘤对于这种联合治疗方式的反应差别明显, 无论是影像学可测肿瘤体积的消退还是病理分级的降期, 有效者只占患者总数的 40%~

70%^[1]。因此, 对于肿瘤治疗反应的预测, 给予患者有选择的治疗, 成为临床治疗的需要。K-ras 基因是 ras 癌基因家族中的一员, 它的突变与直肠癌的发生发展密切相关。众多的体外试验证明 K-ras 基因的突变与放射抵抗存在着相关性^[2-4], 抑制突变型 K-ras 基因的表达可以起到放射增敏的作用^[5]。但是在体内有关 K-ras 基因型与直肠癌患者放化疗后的疗效相关性报道很少, 故本研究 K-ras 基因型与直肠癌患者术前放化疗后病理反应的关系, 探讨 K-ras 基因型预测直

作者介绍: 王伟 (1978-), 男, 主治医师, 硕士,

研究方向: 直肠癌放射治疗研究。

通信作者: 丁喆, 女, 副主任医师, Email: jessiedz2001@hotmail.com。

基金项目: 宁夏自然科学基金资助项目 (编号: NZ09137)。

肠癌术前放化疗治疗效果的临床意义。

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集 2007 年 2 月–2011 年 3 月宁夏医科大学总医院放疗科收治的、经病理确诊的直肠癌患者共 46 例。所有患者的入组条件符合以下标准:(1)术前经肠镜活检病理证实为直肠癌,癌灶下缘距肛门 ≤ 8 cm;(2)术前行盆腔 CT 或 MRI 检查,证实肿瘤分期为 $T_{3-4}N_{0-2}M_0$ 期;(3)年龄 ≤ 78 岁;(4)胸片及腹部 B 超、CT 检查排除肺、肝等主要器官转移;(5)临床常规检验,主要器官功能基本正常;(6)未接受过其他抗肿瘤治疗。

46 例患者中,男性 30 例(65.2%),女性 16 例(34.8%);年龄 23~78 岁,中位年龄 50 岁;肿瘤距肛缘 2~8 cm,平均(4.58 $\pm$ 1.55) cm;放化疗前患者 TNM 分期为: $cT_3N_0M_0$ 32 例(69.5%), $cT_3N_1M_0$ 8 例(17.4%), $cT_3N_2M_0$ 1 例(2.1%), $cT_4N_0M_0$ 4 例(8.7%), $cT_4N_1M_0$ 1 例(2.2%)。

1.2 治疗方案

所有患者均接受术前放化疗+手术治疗。放疗方案:直线加速器 6~10 MV X 线照射,照射范围上至骶骨岬,下至肛缘,包括直肠周围、骶前、髂内血管和淋巴结;三维适形放射治疗,照射总剂量 50 Gy,分次剂量 2.0 Gy/(次·d),每周照射 5 d。联合化疗方案:同期给予口服卡培他滨,剂量 1 600 mg/($m^2 \cdot d$),分 2 次口服,连服 14 d,休息 7 d 为 1 个周期。手术方案:患者于放化疗结束后 6~8 周接受手术治疗。术后患者 TNM 病理分期: $ypT_0N_0M_0$ 2 例(4.3%), $ypT_1N_0M_0$ 1 例(2.1%), $ypT_2N_0M_0$ 13 例(28.3%), $ypT_2N_2M_0$ 1 例(2.1%), $ypT_3N_0M_0$ 11 例(24.0%), $ypT_3N_1M_0$ 9 例(19.5%), $ypT_3N_2M_0$ 4 例(8.7%), $ypT_4N_1M_0$ 2 例(4.3%), $ypT_4N_2M_0$ 3 例(6.5%)。

1.3 治疗效果评价标准

本研究主要探讨直肠癌术前放化疗的近期效果,将术前放化疗后病理消退程度作为治疗效果的判定标准。由有经验的病理医师根据 Dworak's 肿瘤消退分级标准^[6](Tumor regression grade, TRG)进行直肠癌消退等级评定(表 1、图 1),

参照文献定义 TRG2+3+4 为肿瘤消退良好,TRG0+1 为肿瘤无明显消退^[7]。

表 1 肿瘤消退分级

Tab.1 Tumor regression grade (TRG)

分级	定义
TRG 0 肿瘤无消退	肿瘤细胞无变化,无纤维组织;
TRG 1 肿瘤轻度消退	肿瘤组织中伴明显纤维化,但不超过肿瘤的 25%;
TRG 2 肿瘤中度消退	肿瘤组织中伴明显纤维化,纤维化占 26%~50%;
TRG 3 肿瘤消退良好	纤维化细胞长出肿瘤外,占 50%以上;
TRG 4 肿瘤完全消退	完全找不到肿瘤细胞,仅见纤维组织;

1.4 主要试剂

石蜡组织提取 DNA 试剂盒为 QIAGEN 公司 QIAamp DNA FFPE Tissue 试剂盒,PCR 引物设计及合成由上海生物工程有限公司完成,PCR SuperMix I 购自北京全式金生物技术有限公司,DAN 测序由大连宝生物技术有限公司完成。

1.5 实验方法

1.5.1 从石蜡组织中提取 DNA 严格按照 QIAamp DNA FFPE Tissue 试剂盒试验操作要求,将 5~10 μm 厚的石蜡组织切片置于 EP 管中,二甲苯溶蜡、脱蜡,将脱蜡离心后的颗粒悬浮 ATL 缓冲液中,加入 20 μl 蛋白酶 K,涡旋混合水浴孵育后,分别加入 200 μl AL 缓冲液及 200 μl 乙醇(96%~100%),涡旋混合。仔细将溶解产物转移至 QIAamp MinElute 柱中后离心,之后分别添加 500 μl AW1、AW2 缓冲液。全速离心后,将 QIAamp MinElute 柱放入 1 个干净的 1.5 μl 微量离心管中,添加 20~100 μl ATE 缓冲液在膜的中央,高速离心所得液体为从石蜡组织中提取的 DNA,−20℃ 保存。

1.5.2 PCR 扩增 上游引物:5'-AGGCCTGCTGAAAAT-GACT-3';下游引物:5'-AATGCTCTGCACCACTAA-3';配制的 PCR 扩增反应体系 30 μl (15 μl 2 $\times$ TransTaq HiFi PCR SuperMix,上下游引物各 1 μl ,10 μl ddH₂O,3 μl 模板)。反应条件:95℃下 2 min 预变性,95℃下 30 s 变性,61℃下 10 s 退火,72℃下 30 s 延伸,共执行 40 个循环,72℃下 10 min 额外延伸。

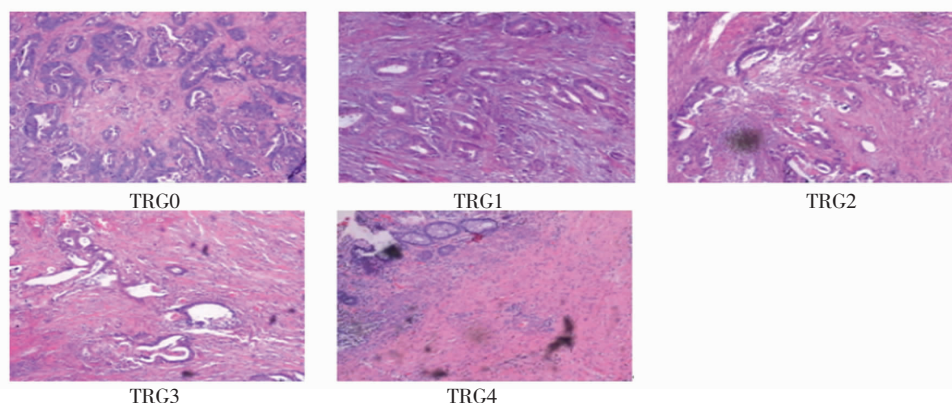


图 1 直肠癌肿瘤消退分级

Fig.1 Rectal cancer regression grade

1.5.3 PCR 扩增产物的鉴定 取 PCR 扩增产物 5 μ l 加 1 μ l 的 Loading buffer 混匀及 Markr(100 bp DNA Ladder)5 μ l 同时上样,在 2% 的琼脂糖凝胶中 120 V 电压电泳 30 min,在紫外凝胶成像仪下观察 PCR 扩增产物的片段大小。

1.5.4 PCR 产物测序 由宝生物(大连)工程有限公司进行 DNA 正反双向测序,所用测序仪为 ABI PRISM™ 377XL DNA Sequencer,测序试剂为 BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit(Applied Biosystems)。

1.6 结果判断

根据 NCBI 获取 K-ras 基因第 2 外显子的标准序列(NC_000012-NM_004985),比对测序图谱,得到碱基突变位点情况。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 软件包进行数据整理和分析。2 组间的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 直肠癌术前放化疗后病理消退程度

接受术前放化疗的直肠癌病患者病理消退情况如下:TRG0 级 1 例(2.17%),TRG1 级 13 例(28.27%),TRG2 级 14 例(30.43%),TRG3 级 16 例(34.78%),TRG4 级 2 例(4.35%)。肿瘤消退良好者 32 例(69.6%),肿瘤无明显消退者 14 例(30.4%)。

2.2 直肠癌组织 K-ras 基因突变情况与病理消退程度的关系

46 例患者成功提取 DNA 43 例,其中 3 例患者石蜡包埋组织未获得。43 例患者中 K-ras 基因突变 15 例(34.9%),其中 12 密码子突变 11 例(73.3%),13 密码子突变 4 例(26.7%)。野生型 K-ras 基因第 12 密码子为 GGT,13 密码子为 GGC,碱基突变及对应氨基酸改变详见表 2。

表 2 直肠癌 K-ras 基因突变类型

密码子	数量	核苷酸突变	氨基酸改变
12 (n=11)	6	GGT→GAT	Gly12Asp (G12D)
	3	GGT→GTT	Gly12Val (G12V)
	2	GGT→AGT	Gly12Ser (G12S)
13 (n=4)	4	GGC→GAC	Gly13Asp (G13D)

将直肠癌患者不同 K-ras 基因型与术前放化疗后病理消退有效分类进行 χ^2 检验。K-ras 基因突变组病理消退良好者 66.7%,野生组病理消退良好者为 67.8%,2 组相比差异无统计学意义($P=0.793$)(表 3)。

表 3 不同 K-ras 基因型之间病理缓解程度的比较

Tab.3 The comparison between the pathologic response in the different K-ras genotypes

组别	TRG2+3+4	TRG0+1	共计
K-ras 基因突变组	10	5	15
KRSA 基因野生组	19	9	28
共计	29	14	43

注: $\chi^2=0.07, P=0.793$

3 讨论

K-ras 基因是 ras 癌基因家族(H-ras、K-ras 和 N-ras)中的一员,它的突变是直肠癌发生的早期事件之一。K-ras 基因在直肠癌中的突变率为 14%~68%,其中第 2 外显子第 12、13 密码子突变占 K-ras 基因突变的 90%~95%^[8]。K-ras 基因表达产物 ras 蛋白(P21)是 EGFR 下游信号通路 RAS-MAPK 中的关键调控因子,ras 蛋白活化后通过上述途径促进核内基因的转录和细胞分裂。有研究显示 ras 蛋白不仅作用于 MAPK,还作用于 EGFR 下游 PI3K-AKT 途径,通过这条途径发挥抗凋亡、加强细胞损伤修复的生物学作用^[5,9]。ras 蛋白主要通过 2 种途径活化:一种是上游 EGFR 信号的传导激活;另一种 K-ras 基因突变,使 ras 蛋白构象发生改变,表现为 ras 蛋白持续活化状态,不受上游 EGFR 信号调控,持续激活 EGFR 下游信号通路。辐射所致细胞 DNA 双链损伤断裂是放射治疗杀灭肿瘤的主要形式,细胞损伤修复能力的增强与放疗敏感性密切相关。不同 K-ras 基因型决定肿瘤细胞不同的增殖状态也影响着肿瘤细胞的放射敏感性。

体外研究发现 K-ras 基因突变会导致肿瘤细胞放射抵抗,突变型肿瘤细胞相比野生型肿瘤细胞在放射治疗后表现出更高的细胞存活率^[4]。使用药物或 SiRNA 技术抑制直肠癌细胞株突变 K-ras 基因的表达,可明显降低肿瘤细胞放射后的存活,间接证明 K-ras 基因突变在人类肿瘤细胞中发挥着放射抵抗的作用^[5,10]。在肿瘤细胞放射抵抗的机理研究中,有研究发现突变型 K-ras 基因表达产物 ras 蛋白通过直接(磷酸化)或者自分泌作用促进 EGFR 配体 ARG 生成增加,间接激活 PI3K/AKT 途径,加强放射治疗后细胞损伤的修复,导致了肿瘤细胞的放射抵抗^[4]。

然而,影响肿瘤放射敏感性的因素是多元性的,K-ras 基因在体内复杂的信号调节环境中是否与放射敏感存在相关性,这方面的研究报道较少。Pedro Luna-Pérez 等^[11]研究发现 c-K-ras 基因 12-丝氨酸、12-天门冬氨酸、13-天门冬氨酸、61-组氨酸对应基因突变的肿瘤患者在接受术前放化疗时表现出良好反应,这些位点的突变与肿瘤惰性的生物学行为有关。但 Jochen Gaedcke 等^[12]研究发现 K-ras 基因的突变与术前放化疗后的病理反应没有相关性,也不能作为复发或者生存期的预测因子。显然,上述两者的研究结果相反,并且与体外关于 K-ras 基因突变导致肿瘤细胞放射抵抗的结论不一致。在本试验研究中,K-ras 基因突变组和野生组中肿瘤组织消退良好者分别为 66.7%和 67.8%,二者相比差异无统计学意义($\chi^2=0.07, P=0.793$),K-ras 基因突变型和野生型的 II、III 期直肠癌患者术前放化疗后病理消退程度无差异,这与 Jochen Gaedcke 等^[12]、Bengala C 等^[13]的研究结果一致,K-ras 基因的状态与直肠癌术前放化疗的疗效无相关性。体外研究发现 K-ras 基因突变导致放射抵抗,但 K-ras 基因突变型和野生型的患者在临床治疗效果中并没有表现出差异,提示体内有多种因素与 K-ras 基因发生相互作用,影响其增强放射损伤修复能力的作用,具体机制尚不明确,有待进一步研究。另有研究显示:在 K-ras 基因突变亚型中,G12V、G13D 的突变

预示着肿瘤具有较强的侵袭性生物学行为^[14], Jochen Gaedcke 等^[12]研究认为 G12V、G13D 的突变与术前放化疗后的病理缓解差存在着具有统计学意义的趋势, G12V 相比 G13D 表现出更差的肿瘤消退。在本试验中, 因样本例数的限制未能进行分层相关研究, 需要增加样本例数进一步分析 K-ras 基因突变亚型与病理参数之间的关系。

总之, 通过从 43 例术前放化疗的直肠癌患者活检石蜡组织中提取 DNA, 明确 K-ras 基因类型, 证明 K-ras 基因突变型和野生型的直肠癌患者在术前放化疗后肿瘤病理消退程度上无差异, 即 K-ras 基因突变不能作为术前放化疗患者肿瘤组织病理消退的预测因子。但是, K-ras 基因突变亚型与病理反应及预后的相关性将在后期试验中进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Kelley S T, Coppola D, Yeatman T, et al. Tumor response to neoadjuvant chemoradiation therapy for rectal adenocarcinoma is mediated by p53-dependent and caspase 8-dependent apoptotic pathways[J]. Clin Colorectal Cancer, 2005, 5(2): 114-118.
- [2] Bernhard E J, Stanbridge E J, Gupta S, et al. Direct evidence for the contribution of activated N-ras and K-ras oncogenes to increased intrinsic radiation resistance in human tumor cell lines[J]. Cancer Res, 2000, 60(23): 6597-6600.
- [3] Gupta A K, Bakanauskas V J, Cerniglia G J, et al. The Ras radiation resistance pathway[J]. Cancer Res, 2001, 61(10): 4278-4782.
- [4] Toulany M, Dittmann K, Kruger M, et al. Radioresistance of K-ras mutated human tumor cells is mediated through EGFR-dependent activation of PI3K-AKT pathway[J]. Radiother Oncol, 2005, 76(2): 143-150.
- [5] Kim I A, Bae S S, Fernandes A, et al. Selective inhibition of Ras, phosphoinositide 3 kinase, and Akt isoforms increases the radiosensitivity of human carcinoma cell lines[J]. Cancer Res, 2005, 65(17): 7902-

7910.

- [6] Dworak O, Keilholz L, Hoffmann A, et al. Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy[J]. Int J Colorectal Dis, 1997, 12(1): 19-23.
- [7] Rödel C, Martus P, Papadopoulos T, et al. Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer[J]. Clin Oncol, 2005, 23(34): 8688-8696.
- [8] Di Fiore F, Blanehard F, Chathonnier F, et al. Clinical relevance of K-ras mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by cetuximab Plus chemotherapy[J]. Br J Cancer, 2007, 96(8): 1166-1169.
- [9] Raponi M, Winkler H, Dracopoli N, et al. K-ras mutations predict response to EGFR inhibitors[J]. Curr Opin Pharmacol, 2008, 8(4): 413-418.
- [10] Bernhard E J, McKenna W G, Hamilton A D, et al. Inhibiting Ras prenylation increases the radiosensitivity of human tumor cell lines with activating mutations of ras oncogenes[J]. Cancer Res, 1998, 58(8): 1754-1761.
- [11] Luna-Perez P, Segura J, Alvarado I, et al. Specific c-K-ras gene mutations as a tumor-response marker in locally advanced rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy[J]. Ann Surg Oncol, 2000, 7(10): 727-731.
- [12] Gaedcke J, Grade M, Jung K, et al. K-ras and BRAF mutations in patients with rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy[J]. Radiother Oncol, 2010, 94(1): 76-81.
- [13] Bengala C, Bettelli S, Bertolini F, et al. Prognostic role of EGFR gene copy number and K-ras mutation in patients with locally advanced rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy[J]. Br J Cancer, 2010, 103(7): 1019-1024.
- [14] Andreyev H J, Norman A R, Cunningham D, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'rasCAL II' study[J]. Br J Cancer, 2001, 85(5): 692-696.

(责任编辑: 冉明会)

(上接第 9 页)

窦。该分型与冠状动脉穿孔后心包填塞的发生率、病死率等密切相关。Ⅰ、Ⅱ型相对稳定, 但有迟发心包填塞的可能, 一般球囊压迫和置入支架可解决, 多不需停用常规抗血小板和抗凝药物; Ⅲ型的病死率及其他事件发生率高, 多需心包引流, 若抽出大量心包积液, 可行自体回输, 有助于维持血压, 改善患者血容量不足及纠正贫血, 但需要注意回输心包内血液量过大(>800~1 000 ml)有可能导致弥漫性血管内凝血的不良后果^[4]。停用抗血小板和抗凝药物、中和肝素、输血、置入带膜支架, 少数可能需额外介入治疗或外科手术。

本例患者发生冠脉穿孔原因有三个: ①患者年龄大, 全程冠脉为钙化病变; ②为了给患者节约经费, 使用了支架球囊后扩张, 而没有选择顺应性的高压球囊; ③因为支架中段贴壁不满意, 使用了较大的后扩压力。通过造影确诊为Ⅲ型冠脉穿孔, 迅速予以心包穿刺及心包液自体回输, 置入带膜支架, 成功封堵穿孔, 使患者生命体征恢复, 病人转危为安。

患者术前多次晕厥考虑右冠病变导致的窦房结供血减

少, 支架术后窦房结供血改善其功能随之恢复。患者于术后 21 h 突发心悸、气促、大汗、恶心等不适, 应高度怀疑迟发性心包填塞的可能。急诊行心脏彩超示心包积液较前无明显增加, 故排除迟发性心包填塞可能, 考虑临床症状为心功能不全所致, 予以相应处理后好转。

参 考 文 献

- [1] Ellis S G, Ajluni S, Arnold A Z, et al. Increased coronary perforation in the new device era: Incidence, classification, management, and outcome[J]. Circulation, 1994, 90: 2725-2730.
- [2] 马长生, 陈 新. 积极仔细地处理急性心脏压塞. 中华心律失常学杂志, 2003, 7(5): 261-262.
- Ma C S, Chen X. Manage acute cardiac tamponade actively and carefully[J]. Chinese Journal of Cardiac Arrhythmias, 2003, 7(5): 261-262.

(责任编辑: 冉明会)