短篇论著

文章编号:1000-5404(2011)21-2300-02

胰腺癌中 *K-ras* 基因突变检测及其临床意义的初步探讨

王正松[1],龚春梅[2], 陈艳丹[2],邓少丽[2] (617200 四川 米易,米易县人民医院检验科[1]; 400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所检验科[2])

[摘要] **目的** 用基因测序法检测胰腺癌患者 *K-ras* 基因突变位点,初步探讨 *K-ras* 基因对胰腺癌检测的临床意义。**方法** 筛选20例来自肝胆外科胰腺相关疾病患者手术标本,经过病理切片证实后分成良性病变对照组和胰腺癌恶性病变组共2组,每组各10例,采用普通的PCR方法扩增人类基因组中的 *K-ras* 基因,并采用 ABI 3100 DNA 测序仪对扩增的片段进行测序分析,检测良性病变对照组和胰腺癌恶性病变组标本突变情况,用 SPSS 统计学软件计算 *K-ras* 基因突变率与胰腺癌恶性病变的相关性。**结果** 良性病变对照组标本 *K-ras* 基因第12位、13位密码子没有发生突变;胰腺癌恶性病变组有8例发生突变(80%),其中7例胰腺标本 *K-ras* 基因的第12位密码子发生突变,1例胰腺标本 *K-ras* 基因的第13位密码子发生突变。**结论** 在实验室建立基因测序法检测胰腺癌患者 *K-ras* 基因突变位点的方法成功,可以推广使用;胰腺癌恶性病变组织 *K-ras* 基因的突变与胰腺癌有显著相关性,且第12位密码子为突变的热点位置。

[关键词] 胰腺癌;*K-ras* 基因;基因测序法

[中图法分类号] R735.9; R394-33; R394.3 [文献标志码] A

Ras 癌基因是第一个被鉴定的人类癌基因。其中,*K-ras* 基因对人类癌症的影响最大。据相关文献报道,相当部分的胰腺癌、结肠癌以及肺癌常由 *K-ras* 基因的突变引起,而在胰腺癌患者中 *K-ras* 基因的突变率高达70% ~100%[1-3],远远高于在其他癌症中的突变率。众所周知,胰腺癌是一种恶性程度极高,预后极差的消化系统恶性肿瘤[4]。基于目前现有的技术手段,胰腺癌的诊断以及治疗的进展不是很大。本研究旨在实验室建立基因测序法检测 *K-ras* 基因突变位点,对胰腺癌患者的胰腺组织中 *K-ras* 基因进行测序分析,观察其突变情况,并初步探讨 *K-ras* 基因对胰腺癌检测的临床意义。

1 资料与方法

1.1 研究对象选择

20例患者系重庆市第三军医大学大坪医院野战外科研究所肝胆外科2009年8月至2010年3月胰腺相关疾病住院患者,根据术前影像学和术后快速病理学诊断分为胰腺良性病变对照组和胰腺癌恶性病变组,良性病变中男性6例,女性4例,年龄分布在41~65岁,平均年龄53岁;胰腺癌恶性病变中男性7例,女性3例,年龄分布在45~66岁,平均年龄55岁。胰腺组织标本均从胰腺手术过程中获取,新鲜标本经过冰冻处理(-20℃)以备后用。

1.2 主要试剂及仪器

DNA 提取试剂盒、*K-ras* 反应液、*Taq* 酶 + UNG 酶、碱性磷酸酶混合物(SAP MIX)、测序试剂(bigdye)、DNA 溶解液(Hi-Di Formamide)、测序引物、阴性对照(上海申友生物技术有限责任公司);扩增引物(上海生物工程技术服务公司合成); ABI 3100 DNA 测序仪、测序分析软件 Chromas(美国应用生物系统公司)、Biorad iCycler PCR 仪、紫外透射分析仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.3 胰腺组织 DNA 提取

严格按照 DNA 提取试剂盒操作说明书操作,提取各标本 DNA 后,用高精度紫外分光光度计测定提取的 DNA 的纯度以及含量。

1.4 *K-ras* 基因扩增及产物检测

根据 *K-ras* 基因序列设计下述引物对:上游引物:5′-TACTGGTGGAGTATTTGATA-3′;下游引物:5′-CAAGATTTACCTCTATTGTT-3′;扩增片段长度:193 bp。反应体系:总体积21.5 μl,ddH_2O 18 μl, *Taq* 酶1.5 μl,10 μmol/L 的上下游引物各0.5 μl,dNTP 1 μl。反应条件:42 ℃ 5 min;93 ℃ 3 min;94 ℃ 10 s,59 ℃ 30 s,72 ℃ 40 s,40个循环;72 ℃ 10 min。反应完毕后2.0%的凝胶电泳30 min,电压100 V。

1.5 PCR 扩增产物测序

1.5.1 PCR 产物的酶解 PCR 产物取1 μl,再加入2 μl SAP MIX,混匀。在 Biorad iCycler PCR 仪上设定如下程序:37 ℃ 1 h,80 ℃变性15 min。

1.5.2 测序 PCR 反应 吸取 PCR 酶解产物3 μl、测序试剂(bigdye)和测序引物2 μl 进行测序 PCR 扩增反应,在 Biorad iCycler PCR 仪上设定如下程序:37 ℃ 1 min; 96 ℃ 10 s, 50 ℃ 5 s, 60 ℃ 4 min,25个循环。

1.5.3 测序扩增产物纯化 严格按照纯化试剂盒操作说明书要求,纯化后在 Biorad iCycler PCR 仪上设定如下程序:95 ℃

[通信作者] 王正松 ,E-mail:598373517@qq.com

4 min,4 ℃ 4 min。将纯化产物在 ABI 3100 DNA 测序仪上进行电泳。

1.6 统计学分析

数据以计数资料表示,采用 SPSS 12.0 统计软件,两组间进行样本率 χ^2 检验。

2 结果

2.1 *K-ras* 基因测序结果

良性病变对照组 *K-ras* 基因第 12、13 位密码子没有发生突变,为野生型;胰腺癌恶性病变组 *K-ras* 基因第 12 位密码子由 GGT 突变为 GAT,为突变型;胰腺癌恶性病变组 *K-ras* 基因第 13 位密码子由 GGC 突变为 GAC,为突变型。

2.2 统计学分析结果

良性病变对照组 10 例标本 *K-ras* 基因第 12 位、13 位密码子没有发生突变;胰腺癌恶性病变组有 8 例发生突变(80%),与良性病变组比较 $P<0.005$, *K-ras* 基因突变与胰腺癌显著相关。其中 7 例胰腺标本 *K-ras* 基因的第 12 位密码子发生突变,1 例胰腺标本 *K-ras* 基因的第 13 位密码子发生突变。

3 讨论

胰腺癌是一种起病隐匿、症状不典型、早期诊断较难、恶性程度差、预后极差的消化系统常见的恶性肿瘤。胰腺癌的临床诊断主要依靠症状结合影像学手段,当出现明显的临床症状和典型影像学表现时,多已经发展到中、晚期胰腺癌[5]。随着分子生物学技术的快速发展,探寻胰腺癌基因早期诊断显示出极其重要的临床意义。据报道,美国已经把 *K-ras* 基因的检测列为消化系统肿瘤早期诊断的常规项目,而在胰腺癌中 *K-ras* 基因的突变率高达 70% ~100%,而且 *K-ras* 基因突变常常发生在肿瘤形成的早期[6]。因此,早期发现具有手术机会的胰腺癌患者以及进行早期胰腺癌的筛查是胰腺癌患者获得良好预后的最有效手段。

现有的 *K-ras* 基因突变检测方法有:①限制性片段长度多态性分析;②单链构象多肽性分析;③等位特异性寡聚核苷酸探针杂交;④RNA 酶错配剪接分析技术;⑤反转录-聚合酶链式反应,每种方法其特异性和敏感性都有一定的差别[7]。本研究根据实验室现有的条件和技术,建立基因测序法检测胰腺癌患者 *K-ras* 基因突变位点的方法来检测胰腺癌患者胰腺组织中 *K-ras* 基因的突变情况。测序方法是从 DNA 分子碱基的水平判断胰腺组织中 *K-ras* 基因的突变情况,可以认为是检测人类癌基因突变的"金标准",3100 测序仪能够完成新基因测序或比较测序工作,还可进行多种片段分析,包括微卫星 DNA 分析、比较基因型分析、单核苷酸多态性(SNP)研究,具有自动化程度高,样品分析量大的特点。完全可满足中、高级实验室需求,有推广使用的价值,有望成为临床基因突变检测的常用方法。从实验的结果分析中得知,在胰腺癌恶性病变患者中,胰腺标本 *K-ras* 基因的突变率达到 80%,与良性病变对照组存在显著性差别,其中第 12 位密码子的突变率为 70%,第 13 位密码的突变率为 10%,可以看出 *K-ras* 基因第 12 位密码子是发生突变的热点位置。

由于单一 *K-ras* 基因突变诊断胰腺癌存在特异性与敏感性的局限,采用联合检测胰腺组织 *K-ras* 基因和血浆中常用肿瘤标志物的水平,可以大大提高检测的特异性与敏感性。据文献报道,*K-ras* 基因检测联合 CA19-9、CA242、CA50、CEA 的敏感性和特异性分别为 88.4% 和 64.7%, *K-ras* 基因检测联合 CA19-9、CA242 的敏感性和特异性分别为 85.7% 和 71.9%。这两种联合检测被认为是比较理想的检测组合指标[8]。除了 *K-ras* 基因, p53、p16、DPC4 等基因也常用于胰腺癌的诊断[9-10]。

参考文献:

[1] 顾华丽, 田字彬. *ras* 基因突变与肿瘤的关系[J]. 青岛大学医学院学报, 2005, 41(4): 372-375.

[2] Almoguera C, Shibata D, Forrester K, *et al*. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes[J]. Cell, 1988, 53(4): 549-554.

[3] Hruban R H, Wilentz R E, Kern S E. Genetic progression in the pancreatic ducts[J]. Am J Pathol, 2000, 156(6): 1821-1825.

[4] Michaud D S. Epidemiology of pancreatic cancer[J]. Minerva Chir, 2004, 59(2): 99-111.

[5] Rosenberg L. Pancreatic cancer: a review of emerging therapies[J]. Drugs, 2000, 59(5): 1071-1089.

[6] Takaori K, Hruban R H, Maitra A, *et al*. Pancreatic intraepithelial neoplasia[J]. Pancreas, 2004, 28(3): 257-262.

[7] 宋妙丽, 杨晓春, 申咏梅, 等. PCR-SSP 法和基因测序检测人胰腺癌细胞株 Patu 8988 *K-ras* 基因第 12 位密码子点突变及其方式[J]. 苏州大学学报: 医学版, 2008, 28(4): 545-548.

[8] 刘涛, 王春友, 张锦辉. 胰腺癌患者血浆 *K-ras* 基因与肿瘤标志物联合检测及其意义[J]. 临床消化病杂志, 2002, 14(2): 54-56.

[9] Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, *et al*. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma[J]. Cancer Res, 1997, 57(9): 1731-1734.

[10] Eskelinen M J, Haglund U H. Prognosis of human pancreatic adenocarcinoma: review of clinical and histopathological variables and possible uses of new molecular methods[J]. Eur J Surg, 1999, 165(4): 292-306.

(**收稿**:2011-07-09;**修回**:2011-09-01)

(编辑 邓强庭)