

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.05.001

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.05.001>

· 论著 ·

结直肠癌患者 *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* 和 *PIK3CA* 基因突变与其病理特征的关系

代云¹, 郑国华¹, 李青²

(1. 溧阳市人民医院病理科, 江苏 溧阳 213300; 2. 常州市第一人民医院病理科, 江苏 常州 213000)

[摘要] **目的:** 探讨265例结直肠癌患者 *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* 和 *PIK3CA* 基因突变及其病理特征关系。**方法:** 选取2014年12月至2016年12月的265例结直肠癌患者肿瘤组织标本进行回顾性分析, 采用PCR扩增-直接测序法检测 *BRAF* 基因(15外显子600密码子), *KRAS* 基因(12, 13, 61密码子突变), *NRAS* (2号与3号外显子的12密码子、13密码子与61密码子常见的12个突变位点) 及 *PIK3CA* (第9, 20外显子) 基因的突变状态, 分析其与结直肠癌临床病理特征的关系。**结果:** 265例患者中存在 *BRAF* 基因突变率为6.8%(18/265), *KRAS* 基因突变率为32.1%(85/265), *NRAS* 基因突变率为5.7%(15/265), *PIK3CA* 基因突变率为11.3%(30/265)。 *NRAS* 基因和 *KRAS* 基因突变与年龄有关 ($P < 0.05$), 与性别、原发部位、组织学类型、分化程度、TNM分期、区域淋巴结转移、远处转移、术后复发转移均无关 ($P > 0.05$); *BRAF*, *PIK3CA* 基因在原发部位为右半结肠患者中的突变率明显升高 ($P < 0.05$), 但与年龄、性别、组织学类型、分化程度、TNM分期、区域淋巴结转移、远处转移、术后复发转移均无关 ($P > 0.05$)。**结论:** *NRAS*, *PIK3CA* 基因在中国结直肠癌患者中的突变率较低。*KRAS*, *NRAS* 基因突变与年龄相关, *BRAF*, *PIK3CA* 基因与肿瘤原发部位相关, 联合检测这些基因的突变情况可以判断疾病的发生发展。

[关键词] 结直肠癌; *BRAF*; *KRAS*; *NRAS*; *PIK3CA*; 基因突变

Relationship between *BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA* gene mutation and pathological characteristics in patients with colorectal cancer

DAI Yun¹, ZHENG Guohua¹, LI Qing²

(1. Department of Pathology, Liyang People's Hospital, Liyang Jiangsu 213300; 2. Department of Pathology, First People's Hospital of Changzhou, Changzhou Jiangsu 213000, China)

Abstract **Objective:** To study the relationship between *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* and *PIK3CA* gene mutations and pathological characteristics in 265 patients with colorectal cancer. **Methods:** From December 2014 to

收稿日期 (Date of reception): 2017-03-20

通信作者 (Corresponding author): 李青, Email: liqblk@163.com

基金项目 (Foundation item): 常州市卫生局重大项目 (ZD2016018)。This work was supported by the Changzhou Health Bureau Major Projects, China (ZD2016018).

December 2016, tumor tissues of 265 patients with colorectal carcinoma in our hospital were retrospectively analyzed, *BRAF* gene (exon 15 codon 600), *KRAS* (gene mutations of 12,13,61 codon), *NRAS* (2 and 3 in exon 12 codon 13, codon 61 codons and 12 common mutations) and *PIK3CA* (exon 9,20) gene mutation status were detected by PCR-direct sequencing, and its relationship with clinical pathological characteristics of colorectal cancer was analyzed. **Results:** In 265 patients, the *BRAF* gene mutation rate was 6.8% (100/265), *KRAS* gene mutation rate was 32.1% (85/265), *NRAS* gene mutation rate was 5.7% (15/265), *PIK3CA* gene mutation rate was 11.3% (30/265). *NRAS* gene and *KRAS* gene mutation were associated with age ($P<0.05$), and gender, the primary site, histological type, differentiation degree, TNM staging, lymph node metastasis, distant metastasis, recurrence and metastasis were independent ($P>0.05$); *BRAF*, *PIK3CA* gene in the primary site for right colon in patients with mutation rate increased significantly ($P<0.05$), while age, gender, histological type, differentiation degree, TNM staging, lymph node metastasis, distant metastasis, recurrence and metastasis were independent ($P>0.05$). **Conclusion:** *NRAS* or *PIK3CA* has a low level in Chinese rectal cancer patients. *KRAS* and *NRAS* gene mutations were correlated with age, whereas *BRAF* and *PIK3CA* genes are correlated with the primary tumor site. A combined detection of these genes can define the pathogenesis and development of the disease.

Keywords colorectal cancer; *BRAF*; *KRAS*; *NRAS*; *PIK3CA*; gene mutation

结直肠癌是常见的消化道恶性肿瘤, 研究^[1-2]显示结直肠癌的发生、发展与许多分子信号转导通路的调控有密切关系, 可以诱导肿瘤细胞增殖、侵袭、转移以及血管生成。研究^[3]显示 *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* 及 *PIK3CA* 基因的突变状态与肿瘤的发生、发展有一定的关系。为了更好地分析 *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* 和 *PIK3CA* 基因突变与结直肠癌的病理特征的关系, 本研究对结直肠癌组织中的 *BRAF* 基因(15外显子600密码子), *KRAS* 基因(12, 13, 61密码子突变), *NRAS* 基因(2号与3号外显子的12密码子、13密码子与61密码子常见的12个突变位点)及 *PIK3CA* 基因(第9, 20外显子)的突变状态以及与结直肠癌的病理特征的关系进行分析, 旨在更好地判断该病的发生发展。

1 对象与方法

1.1 对象

选取常州市第一人民医院2014年12月至2016年12月的265例结直肠癌患者肿瘤组织标本进行回顾性分析, 纳入标准^[4]: 1) 经过影像学及病理学检查均符合结直肠癌诊断标准; 2) 无直肠癌家族病史; 3) 精神正常, 能配合相应的治疗。排除标准: 1) 不符合结直肠癌的诊断标准; 2) 合并严重的心、肺等重要脏器的疾病; 3) 患者意识不清, 不能正常沟通。经过本医院伦理委员会批准。其中男165例, 女100例, 年龄49~79(52.9±21.2)岁; 其

中腺癌181例, 黏液腺癌55例, 印戒细胞癌12例, 鳞状细胞癌5例, 未分化癌12例。

1.2 方法

1.2.1 样本的制备

将所有患者的肿瘤切除手术的肿瘤组织制作标本, 切取大小为1 cm × 1 cm × 1 cm的组织块, 放置于-80 °C的冰箱中备用。

1.2.2 *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* 和 *PIK3CA* 基因突变的检测

采用PCR扩增-直接测序法进行检测^[5]。使用 *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* 和 *PIK3CA* 基因组DNA提取试剂盒(北京宜科思源科技有限公司)提取患者结直肠癌组织基因DNA, 采用PCR扩增-直接测序法检测 *BRAF*, *KRAS*, *NRAS* 和 *PIK3CA* 基因的突变情况, 测序结果按照相应的软件处理, 并与结直肠癌基因库序列对比分析。PCR反应体系^[6]: 10×PCR缓冲液 2.5 μL, dNTP(2.5 mmol/L) 3 μL, 上下游引物(10 mmol/L)各0.8 μL, LA Taq 酶0.1 μL, DNA模板 2 μL, 无菌水13 μL, 总反应体系为20 μL。PCR反应条件: 95 °C 变性5 min; 95 °C 25 s, 56 °C 退火40 s, 72 °C 15 s, 共46个循环; 72 °C 延伸7 min。目的基因PCR引物序列见表1。

1.3 统计学处理

采用SPSS 22.0软件进行统计学, 计数资料采用例(%)进行表示, 并采用 χ^2 进行检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表1 目的基因PCR引物序列

Table 1 PCR primer sequences

基因外显子	引物序列	片段大小/bp
BRAF		
Exon15	F: 5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3' R: 5'-CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG-3'	211
KRAS		
Exon12	F: 5'-GACGATAGTCATGCCCCGCG-3' R: 5'-AATAGAAGGCACAGTCGAGG-3'	248
Exon13	F: 5'-GTCTAAAAGCTGCGGAATTGT-3' R: 5'-AGTCCAAACTCATCAATGTATCG-3'	222
Exon61	F: 5'-GTAGCGTGTACGGTGGGAGG-3' R: 5'-AACGCACACCGGCCTTATTCT-3'	284
NRAS		
Exon12	F: 5'-CCAGCCTCTTGCTGAGTGGAGATG-3' R: 5'-AAGCCGACAACCTTGATTGGA G-3'	243
Exon13	F: 5'-TGGGAGGTCTATATAAGCAGAG-3' R: 5'-CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG-3'	258
Exon61	F: 5'-AGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCG-3' R: 5'-ACCTACAGGTGGGGTCTTTCATTCCC-3'	287
PIK3CA		
Exon9	F: 5'-AACAGCTCAAAGCAATTCTACAC-3' R: 5'-GGTATGGTAAAAACATGCTGAGA-3'	276
Exon20	F: 5'-GACATTGCATACATTCGAAAGAC-3' R: 5'-GTTTAATTGTGTGGAAGATCCAA-3'	255

2 结果

2.1 BRAF, KRAS, NRAS 和 PIK3CA 基因突变发生情况

265 例患者中存在 BRAF 基因突变率为 6.8%(18/265), KRAS 基因突变率为 32.1%(85/265), NRAS 基因突变率为 5.7%(15/265), PIK3CA 基因突变率为 11.3%(30/265, 表2)。

2.2 BRAF, KRAS, NRAS 和 PIK3CA 基因突变的发生与病理特征的关系

NRAS 基因和 KRAS 基因突变与年龄有关 ($P < 0.05$), 与性别、原发部位、组织学类型、分化程度、TNM 分期、区域淋巴结转移、远处转移、术后复发转移均无关 ($P > 0.05$); BRAF, PIK3CA 基因在原发部位为右半结肠患者中的突变率明显升高 ($P < 0.05$), 但与年龄、性别、组织学类型、分化程度、TNM 分期、区域淋巴结转移、远处转移、术后复发转移均无关 ($P > 0.05$, 表3)。

表2 265例患者发生BRAF, KRAS, NRAS, PIK3CA基因突变情况

Table 2 BRAF, KRAS, NRAS, PIK3CA gene mutations in 265 patients

基因	发生突变例数	突变率/%
BRAF		
15外显子600密码子	18	6.8
KRAS		
12密码子突变	65	32.1
13密码子突变	15	
61密码子突变	5	
NRAS		
12密码子突变	10	5.7
13密码子突变	3	
61密码子突变	2	
PIK3CA		
9外显子突变	20	11.3
20外显子突变	10	

表3 265例患者BRAF, KRAS, NRAS, PIK3CA基因突变与病理特征的关系
Table 3 Relationship between BRAF, KRAS, NRAS, PIK3CA gene mutations and the pathological characteristics in 265 patients

病理指标	n	BRAF/[例(%)]	P	KRAS/[例(%)]	P	NRAS/[例(%)]	P	PIK3CA/[例(%)]	P
性别			0.922		0.571		0.732		0.636
男性	165	11 (6.7)		50 (30.0)		10 (6.1)		20 (12.1)	
女性	100	7 (7.0)		35 (35.0)		5 (5.0)		10 (10.0)	
年龄/岁			0.782		<0.001		0.003		0.409
≥60	109	8 (7.3)		65 (59.6)		12 (11.0)		10 (9.2)	
<60	156	10 (6.4)		20 (12.8)		3 (1.9)		20 (12.8)	
原发部位			0.007		0.845		0.941		0.011
左半结肠	82	14 (17.1)		26 (31.7)		4 (4.9)		20 (24.4)	
右半结肠	89	3 (3.4)		29 (32.5)		5 (5.6)		6 (6.7)	
直肠	94	1 (1.1)		30 (31.9)		6 (6.4)		4 (4.3)	
组织学类型			0.916		0.967		0.768		0.683
腺癌	181	14 (7.7)		65 (35.9)		12 (6.6)		22 (12.2)	
黏液腺癌	55	4 (7.3)		20 (36.4)		3 (5.5)		8 (14.5)	
分化程度			0.912		0.582		0.919		0.889
中高分化	180	12 (6.7)		55 (30.6)		10 (5.6)		20 (11.1)	
低分化	85	6 (7.1)		30 (35.3)		5 (5.9)		10 (11.8)	
TNM分期			0.699		0.689		0.959		0.898
I级	15	1 (6.7)		5 (33.3)		1 (6.7)		2 (13.3)	
II级	75	5 (6.7)		20 (26.7)		4 (5.3)		8 (10.7)	
III级	85	5 (5.9)		30 (35.3)		5 (5.9)		9 (10.6)	
IV级	90	7 (7.8)		30 (33.3)		5 (5.6)		11 (12.2)	
远处转移			0.922		0.571		0.732		0.636
有	100	7 (7.0)		35 (35.0)		5 (5.0)		10 (10.0)	
无	165	11 (6.7)		50 (30.0)		10 (6.1)		20 (12.1)	
术后复发转移			0.829		0.926		0.843		0.785
有	95	6 (6.3)		30 (31.6)		5 (5.3)		10 (10.5)	
无	170	12 (7.1)		55 (32.4)		10 (5.9)		20 (11.8)	
淋巴转移			0.922		0.571		0.732		0.636
有	165	11 (6.7)		50 (30.0)		10 (6.1)		20 (12.1)	
无	100	7 (7.0)		35 (35.0)		5 (5.0)		10 (10.0)	

3 讨论

结直肠癌在发生、发展过程中与表皮生长因子受体(EGFR)有密切关系, 而RAS/RAF/MAPK和PIK3CA/AKT是EGFR的2条下游信号通路, 可以通过EGFR与配体的结合进行激活。*BRAF*, *KRAS*, *NRAS*和*PIK3CA*中任意一个基因发生突变都能够引起EGFR的2条下游信号通路分别处于持续激活状态, 从而引起结直肠癌的发生、发展^[7]。*BRAF*, *KRAS*, *NRAS*都属于RAS/RAF/MAPK信号通路, 肿瘤的发生、发展与其有密切的关系^[8]。*KRAS*, *NRAS*都属于RAS家族。研究^[9]发现*KRAS*基因突变率为30%~40%, *KRAS*基因突变主要发生于第2号外显子的第12, 13密码子和第3号外显子的第59, 61, 117密码子上, *KRAS*可能发生的突变还有双突变或者三突变。*NRAS*基因突变会导致细胞的恶性增殖和转移, 其在血液肿瘤中存在较高的突变风险, *NRAS*基因突变率为5.7%, 其基因突变率较低。*NRAS*基因和*KRAS*基因突变与年龄有关, 高龄患者基因突变率较高。*NRAS*基因和*KRAS*基因突变与其他病理指标均无关。有研究^[10]发现*BRAF*能够介导RAS与MAPK蛋白进行结合, 从而调节肿瘤细胞的增殖、分化和凋亡。本研究显示*BRAF*基因突变率为6.8%, *BRAF*基因在原发部位为右半结肠患者中的突变率明显升高, 但与年龄、性别、组织学类型、分化程度、TNM分期、区域淋巴结转移、远处转移、术后复发转移均无关。*PIK3CA*基因是PIK3CA/AKT信号通路的重要成员, *PIK3CA*基因突变率为11.3%, 其中9号与20号外显子是发生突变的主要部分, *PIK3CA*发生基因突变时会导致结直肠癌患者对抗EGFR药物不应答, 研究^[10]发现*PIK3CA*基因在原发部位为右半结肠患者中的突变率明显升高, 但与其他病理指标均无关。

直肠癌的发生、发展与*BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *PIK3CA*对信号转导通路的调控有密切关系。Eklöf等^[11]在结直肠癌组织*KRAS*, *BRAF*及*PIK3CA*基因突变的检测及其与临床病理特征的关系中研究发现:*KRAS*基因突变与年龄有关, 对这些基因进行联合检测可以判断疾病的情况。吴永芳等^[12]在结直肠癌患者肿瘤组织中*KRAS*, *NRAS*和*BRAF*基因突变的分子病理检测分析中研究发现:*KRAS*, *NRAS*和*BRAF*与结直肠癌患者肿瘤发生、发展有密切关系, 通过对这些基因进行联合检测可以判断疾病的情况。本研究结果显示:*NRAS*基因和*KRAS*基因突变与年龄有关, *BRAF*, *PIK3CA*基因在原发部位为右半结肠患者中的突变

率明显升高, *NRAS*, *PIK3CA*基因在中国结直肠癌患者中的突变率较低。

国内关于*BRAF*, *KRAS*, *NRAS*和*PIK3CA*基因在结直肠癌中突变情况及4种基因联合检测的报道较少, 本研究创新之处在于为结直肠癌基因检测提供宝贵的循证医学数据。

综上所述, *NRAS*, *PIK3CA*基因在中国结直肠癌患者中的突变率较低。*KRAS*, *NRAS*基因突变与年龄相关, *BRAF*, *PIK3CA*基因与肿瘤原发部位相关, 联合检测这些基因的突变可以判断结直肠癌的发生发展情况。

参考文献

1. Cho S, Song IH, Yang HC, et al. Prognostic factors of pulmonary metastasis from colorectal carcinoma[J]. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2013, 17(2): 303-307.
2. Rui Y, Wang C, Zhou Z, et al. K-Ras mutation and prognosis of colorectal cancer: a meta-analysis[J]. *Hepatogastroenterology*, 2015, 62(137): 19-24.
3. di Magliano MP, Logsdon CD. Roles for KRAS in pancreatic tumor development and progression[J]. *Gastroenterology*, 2013, 144(6): 1220-1229.
4. Ahn TS, Jeong D, Son MW, et al. The BRAF mutation is associated with the prognosis in colorectal cancer[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2014, 140(11): 1863-1871.
5. Demes M, Scheil-Bertram S, Bartsch H, et al. Signature of microsatellite instability, KRAS and BRAF gene mutations in German patients with locally advanced rectal adenocarcinoma before and after neoadjuvant 5-FU radiochemotherapy[J]. *J Gastrointest Oncol*, 2013, 4(2): 182-192.
6. Kadowaki S, Kakuta M, Takahashi S, et al. Prognostic value of KRAS and BRAF mutations in curatively resected colorectal cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(4): 1275-1283.
7. Ouerhani S, Bougateg K, Soltani I, et al. The prevalence and prognostic significance of KRAS mutation in bladder cancer, chronic myeloid leukemia and colorectal cancer[J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(6): 4109-4114.
8. Imamura Y, Lochhead P, Yamauchi M, et al. Analyses of clinicopathological, molecular and prognostic associations of KRAS codon 61 and codon 146 mutations in colorectal cancer: cohort study and literature review[J]. *Mol Cancer*, 2014, 13(5): 135.
9. Parsons BL, Myers MB. Personalized cancer treatment and the myth of KRAS wild-type colon tumors[J]. *Discov Med*, 2013, 15(83): 259-267.
10. Yaeger R, Cowell E, Chou JF, et al. RAS mutations affect pattern of

- metastatic spread and increase propensity for brain metastasis in colorectal cancer[J]. *Cancer*, 2015, 121(8): 1195-1203.
11. Eklöf V, Wikberg ML, Edin S, et al. The prognostic role of KRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN in colorectal cancer[J]. *Br J Cancer*, 2013, 108(10): 2153-2163.
12. 吴永芳, 许春伟, 宋业颖, 等. 结直肠癌患者肿瘤组织中KRAS、NRAS和BRAF基因突变的分子病理检测分析[J]. *临床与病理杂志*, 2015, 35(7): 1385-1389.
- WU Yongfang, XU Chunwei, SONG Yeying, et al. The molecular pathology examination analysis of KRAS, NRAS and BRAF gene mutation in colorectal cancer[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2015, 35(7): 1385-1389.

本文引用: 代云, 郑国华, 李青. 结直肠癌患者BRAF, KRAS, NRAS和PIK3CA基因突变与其病理特征的关系[J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(5): 875-880. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.05.001

Cite this article as: DAI Yun, ZHENG Guohua, LI Qing. Relationship between BRAF, KRAS, NRAS, PIK3CA gene mutation and pathological characteristics in patients with colorectal cancer[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2017, 37(5): 875-880. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.05.001