

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.04.017

◇临床医学◇

K-RAS 蛋白表达及基因状态在胃癌组织中的临床意义

宗桂娟^{1a}, 尹海兵^{1a}, 李春笋^{1a}, 陈旭东^{1a}, 蔡南南², 杨磊^{1b}, 赵斌^{1a}, 何松^{1a}作者单位:¹南通市肿瘤医院,^a病理科,^b肿瘤内科,江苏南通226361;²南通大学杏林学院,江苏南通226019

通信作者:何松,男,主任医师,教授,博士生导师,研究方向为消化道肿瘤、淋巴造血系统肿瘤,E-mail:ntzlyhesong515@ntu.edu.cn

基金项目:南通市科技项目(HS2015003)

摘要:目的 分析胃癌病人的K-RAS蛋白表达及基因状态与临床病理特征的关系,为胃癌病人的个性化治疗提供指导。方法 选取2016年1月至2017年12月南通市肿瘤医院314例胃癌病人,分别采用免疫组织化学法及荧光定量PCR的方法分析K-RAS蛋白表达水平和基因突变状态。**结果** 314例胃癌组织中K-RAS蛋白表达与胃癌病人的年龄($P=0.648\ 5$)、性别($P=0.585\ 8$)、肿瘤大小($P=0.761\ 1$)、脉管侵犯($P=0.552\ 4$)、淋巴结转移均无明显关系($P=0.506\ 4$),与组织学分级密切相关($P=0.019\ 5$);K-RAS基因突变类型包括G12D、G13D、G12A、G12S、G13S;不同性别($P=0.456\ 6$)、年龄($P=0.524\ 2$)、组织分化之间($P=0.747\ 4$)的K-RAS突变率差异无统计学意义;K-RAS基因突变率与蛋白表达检出率差异有统计学意义($P=0.037\ 7$)。**结论** K-RAS的蛋白表达程度与肿瘤的分化程度有关,K-RAS基因在不同性别、年龄、组织分化之间的突变率差异无统计学意义,且K-RAS基因突变率与蛋白表达不一致。

关键词:胃肿瘤; 基因,ras; 突变; 免疫组织化学; 荧光免疫测定; K-RAS; 临床病理特征

Clinical significance of K-RAS protein expression and gene status in gastric carcinoma

ZONG Guijuan^{1a}, YIN Haibing^{1a}, LI Chunsun^{1a}, CHEN Xudong^{1a}, CAI Nannan², YANG Lei^{1b}, ZHAO Bin^{1a}, HE Song^{1a}

Author Affiliations: ^{1a}Department of Pathology, ^{1b}Department of Oncology, Nantong Tumor Hospital, Nantong, Jiangsu 226361, China; ²Nantong University, Nantong, Jiangsu 226019, China

Abstract: Objective To analyze the relationship between K-RAS protein expression and gene status and clinicopathological features in patients with gastric carcinoma, and to provide guidance for personalized treatment of gastric carcinoma patients. **Methods** A total of 314 patients with gastric cancer in Nantong Cancer Hospital from January 2016 to December 2017 were selected. The expression level of K-RAS protein and the state of gene mutation were analyzed by immunohistochemical method and fluorescent quantitative PCR. **Results** The expression of K-RAS protein in 314 cases of gastric carcinoma had no significant relationship with age ($P=0.648\ 5$), sex ($P=0.585\ 8$), tumor size ($P=0.761\ 1$), vascular invasion ($P=0.552\ 4$) and lymph node metastasis ($P=0.506\ 4$), which was closely related to histological grade ($P=0.019\ 5$). K-RAS gene mutation types include G12D, G13D, G12A, G12C, G13S; K-RAS mutation rates were not significantly different between genders ($P=0.456\ 6$), age ($P=0.524\ 2$), and tissue differentiation ($P=0.747\ 4$). K-RAS gene mutation rate and protein expression detection rate were statistically different ($P=0.037\ 7$). **Conclusion** The protein expression of K-RAS is related to the degree of tumor differentiation. There is no significant difference in the mutation rate between K-RAS gene in different gender, age and tissue differentiation, and the K-RAS gene mutation rate is inconsistent with protein expression.

Key words: Stomach neoplasms; Genes, ras; Mutation; Immunohistochemistry; Fluoroimmunoassay; K-RAS; Clinicopathological characteristics

胃癌是最常见的消化道恶性肿瘤之一,其发病率和病死率逐年上升,严重危害人类健康^[1]。多数胃癌病人即使采用围手术期化疗及辅助化疗,生存率仍较低。因此寻找新的治疗途径如分子靶向治疗成为胃癌研究的热点^[2-3]。K-RAS基因编码的p21-ras蛋白位于细胞质膜上转导细胞生长与分化的信号^[4]。K-RAS突变主要发生在12、13和61编码子

上,这些突变可造成K-RAS基因激活^[5-7]。结直肠癌病人存在40%~45%K-RAS基因突变,可导致细胞持续生长,抑制细胞凋亡^[6]。目前K-RAS基因在结直肠癌方面的研究较多,但在胃癌中的研究却鲜有报道^[7]。本研究采用免疫组化法、PCR法检测胃癌中K-RAS蛋白表达和基因状态,将胃癌组织中K-RAS蛋白表达、基因状态与病人临床参数进行分

析。并探讨K-RAS基因突变与蛋白表达水平是否存在一致性,旨在为胃癌靶向治疗提供帮助。

1 材料与方法

1.1 材料 314例胃癌组织样本来自南通市肿瘤医院。选取自2016年1月至2017年12月胃癌病人手术切除的标本。纳入标准:无合并其他恶性肿瘤或者胃癌复发后再次手术者,临床病理资料完整,术前未行放疗及其他抗肿瘤治疗,手术病理诊断明确为胃癌。男233例,女81例。年龄范围为32~88岁,中位年龄65岁。病人或近亲属对研究方案签署知情同意书,本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

1.2 实验试剂 免疫组织化学法(免疫组化)所用抗体即用型试剂盒和一抗均购自Proteintech公司;人组织基因组核酸提取试剂盒(货号为DE02003)及核酸提取仪均来自上海科亦生物科技有限公司。

1.3 免疫组化 免疫组化染色采用EnVision(二步法)完成。K-RAS一抗工作浓度为1:500,抗原修复方式为热修复(Trish EDTA pH9.0)97℃,30 min。具体操作步骤严格按试剂盒说明书进行。结果判定:PBS代替一抗作为阴性对照,已知阳性的肝癌组织切片为阳性对照。Fromowitz综合计分法将细胞着色强度与阳性细胞所占百分比二者综合判定,阳性细胞百分数为10个视野阳性细胞平均数占其细胞总数的百分比:<5%计0分;5%~25%计1分;26%~50%计2分;51%~75%计3分;>75%计4分。细胞着色强度:不着色计0分;淡黄色计1分;棕黄色计2分;棕褐色计3分。二者积分相加:0~1分为阴性,≥2分为阳性^[8]。

1.4 荧光定量PCR 基因组DNA的提取按照试剂盒说明书进行;本实验所用引物为,正向5'-ATT TTT ATT ATA AGG CCT GCT G-3'和反向5'-CAA AGA ATG GTC CTG CAC CAG-3';20μL PCR反应体系包括10 μL的2×Expfu Mix、15 pmol的正向引物、15 pmol的反向引物和3 μL的样品,加入PCR水体系补足至20 μL;PCR程序如下:95℃预变性5 min,接着进行35个扩增循环:95℃ 10 s,58℃ 35 s,72℃ 15 s,随后72℃ 5 min延伸。PCR产物测序由上海科亦生物有限公司完成。

1.5 统计学方法 应用SPSS 15.0软件进行数据处理及统计学分析,计数资料以例(%)表示,结果比较采用χ²检验。P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 K-RAS蛋白表达与胃癌临床病理特征的关系 根据病人的性别、年龄、肿瘤大小、分化程度、

有无淋巴结转移、有无脉管侵犯等病理参数,将314例病人标本进行分组。通过统计学分析,结果显示K-RAS蛋白表达阳性率为13.05%,其表达与病人性别(P=0.585 8)、年龄(P=0.648 5)、肿瘤大小(P=0.761 1)、脉管侵犯(P=0.552 4)、有淋巴结转移差异无统计学意义(P=0.506 4);与组织学分化程度差异有统计学意义(P=0.019 5)。各组K-RAS蛋白表达情况见表1。

表1 K-RAS蛋白表达与胃癌临床特征的关系/例

临床病理参数	例数	K-RAS表达		χ ² 值	P值
		阴性	阳性		
性别				0.297 0	0.585 8
女	81	69	12		
男	233	204	29		
年龄				0.207 8	0.648 5
<60岁	68	58	10		
≥60岁	246	215	31		
肿瘤长径				0.092 4	0.761 1
<5 cm	183	160	23		
≥5 cm	131	113	18		
组织学分级				5.453 0	0.019 5
中高分化	95	89	6		
低分化	219	184	35		
脉管侵犯				0.353 1	0.552 4
无	136	120	16		
有	178	153	25		
淋巴结转移				0.441 6	0.506 4
无	75	67	8		
有	239	206	33		

2.2 分析不同年龄、性别、组织学分级胃癌病人基因K-RAS突变情况 通过分析发现314例胃癌组织K-RAS基因状态,其中K-RAS基因突变8例,突变率为2.54%,且K-RAS基因突变频率在不同性别(P=0.456 6)、年龄(P=0.524 2)及组织学分级(P=0.747 4)胃癌病人中差异无统计学意义。各组K-RAS基因突变频率见表2。

表2 胃癌病人中不同年龄、性别、组织学分级群体中K-RAS基因的突变频率/例(%)

K-RAS突变类型	突变频率					
	年龄		性别		组织学分级	
	≥60岁 (n=246)	<60岁 (n=68)	男 (n=233)	女 (n=81)	中高分化 (n=95)	低分化 (n=219)
G12D	3(1.22)	0(0.00)	1(0.43)	2(2.47)	1(1.05)	2(0.91)
G13D	1(0.41)	1(1.47)	1(0.43)	1(1.23)	1(1.05)	1(0.46)
G12A	1(0.41)	0(0.00)	1(0.43)	0(0.00)	0(0.00)	1(0.46)
G12C	1(0.41)	0(0.00)	1(0.43)	0(0.00)	0(0.00)	1(0.46)
G13S	1(0.41)	0(0.00)	1(0.43)	0(0.00)	0(0.00)	1(0.46)
合计	7(2.85)	1(1.47)	5(2.15)	3(3.70)	2(2.11)	6(2.74)

2.3 K-RAS 基因突变与蛋白表达的关系 PCR 法检测胃癌组织中 K-RAS 基因状态,结果显示 K-RAS 突变 8 例(突变率为 2.54%),突变类型包括 G12D (3 例)、G13D(2 例)、G12A(1 例)、G12S(1 例)、G13S (1 例);此外,基因突变病人中 3 例免疫组化检测结果为阳性,即免疫组化结果与基因突变率结果相同者 3 例。K-RAS 基因突变率与蛋白表达的检出率不同($P=0.0377$),故两者关联性低。见表 3。

表 3 K-RAS 基因突变及 K-RAS 蛋白表达分布/例(%)

K-RAS 蛋白表达	K-RAS 基因状态	
	野生	突变
阴性	268(87.58)	5(62.5)
阳性	38(12.42)	3(37.5)
合计	306(100)	8(100)

注:K-RAS 基因突变率与蛋白表达的检出率比较, $\chi^2=4.320$, $P=0.0377$

3 讨论

RAS 基因家族包括 H-RAS、K-RAS、N-RAS 基因,分别编码 H-RAS、K-RAS、N-RAS 蛋白,它们具有相似的结构和功能^[9]。RAS 蛋白位于细胞膜内侧,将 EGFR 的信号转导给 MAPKs,进而调控细胞的生长、增殖及血管生成^[10-11]。一般情况下 K-RAS 基因处于相对静止状态,当受到持续刺激作用与政策细胞激活 K-RAS,导致细胞恶性生长,促进肿瘤发生发展^[12-13]。因此研究 K-RAS 在胃癌发生发展中的作用具有重要的临床意义。

本研究结果显示胃癌 K-RAS 蛋白表达与病人性别、年龄、肿瘤大小、脉管侵犯、有无淋巴结转移无明显关系($P>0.05$);但 K-RAS 蛋白表达与分化程度密切相关($P<0.05$),提示 K-RAS 可能参与了胃癌的发展进程。Kikuchi 等应用免疫组化法研究 K-RAS 在 80 例胃癌表达情况,结果发现随着胃癌分化程度的增加则表达升高,与本研究结果一致^[14]。

K-RAS 基因突变率在不同肿瘤中明显不同。文献报道胰外分泌腺癌基因突变率高达 90%,结肠癌为 40%~50%,肺癌和膀胱癌为 40%,而胃癌在 10% 以下^[15]。本实验检测 314 例胃癌组织 K-RAS 基因状态,其中 K-RAS 基因突变 8 例,突变率为 2.54%。K-RAS 基因突变结果与国外研究一致。K-RAS 基因在不同性别、年龄、组织分化之间的突变率无显著差异。K-RAS 突变与病人缺乏对 EGFR 单抗的反应有关,突变者不适用西妥昔单抗治疗^[16]。2010 年 NCCN 临床指南中推荐:结直肠癌病人在接

受西妥昔单抗治疗前,进行 K-RAS 基因突变检测,确定是否接受该靶向治疗^[17-18]。另外本研究中 K-RAS 蛋白的阳性率为 13.05%,其蛋白阳性率远高于基因突变率。因此 K-RAS 的免疫组化结果不能替代基因突变检测结果,对于考虑选用西妥昔单抗治疗的病人,可以采用荧光定量 PCR 法检测 EGFR 及 K-RAS 基因状态。

综上,K-RAS 在胃癌中的蛋白表达可能作为判断胃癌恶性程度的分子生物学标志物。K-RAS 基因的突变状态和靶向 EGFR 单克隆抗体的治疗效果相关,因此胃癌病人可通过 K-RAS 基因检测结果采用个体化治疗。

参考文献

- [1] CHEN W, ZHENG R, BAADDE PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] 甘建春, 白铁成. 胃癌血清肿瘤标志物的研究进展[J]. 安徽医药, 2013, 17(9): 1464-1466.
- [3] ZINATIZADEH MR, MOMENI SA, ZARANDI PK, et al. The role and function of ras-association domain family in cancer: A Review[J]. Genes Dis, 2019, 6(4): 378-384.
- [4] XIONG ZF, SHI J, FU ZH, et al. Phenotypic classification of gastric signet ring cell carcinoma and its relationship with K-ras mutation[J]. Genet Mol Res, 2017, 16(2). DOI: 10.4238/gmr16029181.
- [5] PANT S, HUBBARD J, MARTINELLI E, et al. Clinical update on K-Ras targeted therapy in gastrointestinal cancers [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2018, 130: 78-91.
- [6] MASTROMATTEO P, CORRENTI M, CAVAZZA ME, et al. Evaluation of K-ras 12 oncogene mutations in venezuelan patients with helicobacter pylori infection [J]. Invest Clin, 2005, 46(4): 337-345.
- [7] AYATOLLAHI H, TAVASSOLI A, JAFARIAN AH, et al. KRAS Codon 12 and 13 Mutations in Gastric Cancer in the Northeast Iran [J]. Iran J Pathol, 2018, 13(2): 167-172.
- [8] SC PC, PU F. Free radical production in immune cell systems induced by Ti, Ti6Al4V and SS assessed by chemiluminescence probe pholasin assay [J]. Int J Biomater 2012, 2012: 380845. DOI: 10.1155/2012/380845.
- [9] 袁笑, 郭涛, 陆震, 等. 324 例不同年龄段胃癌患者临床病理资料分析[J]. 安徽医药, 2014, 18(9): 1679-1681.
- [10] FROMOWITZ FB, VIOLA MV, CHAO S, et al. ras p21 expression in the progression of breast cancer [J]. Hum Pathol, 1987, 18(12): 1268-1275.
- [11] SPELLA M, MARAZIOTI A, KAM A, et al. RAS oncogenes direct metastasis [J]. Mol Cell Oncol, 2017, 4(5): e1345711. DOI: 10.1080/23723556.2017.1345711.
- [12] HERRERO A, PINTO A, COLÓN-BOLEA P, et al. Small molecule inhibition of ERK dimerization prevents tumorigenesis by RAS-ERK pathway oncogenes [J]. Cancer Cell, 2015, 28(2): 170-182.
- [13] ALLEGRA CJ, RUMBLE RB, SCHILSKY RL. Extended RAS

- gene mutation testing in metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy: american society of clinical oncology provisional clinical opinion update 2015 summary[J]. *J Oncol Pract*, 2016, 12(2): 180-181.
- [14] ER TK, CHEN CC, BUJANDA L, et al. Current approaches for predicting a lack of response to anti-EGFR therapy in KRAS wild-type patients [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 591867. DOI: 10.1155/2014/591867.
- [15] SONG IS, OH NS, KIM HT, et al. Human ZNF312b promotes the progression of gastric cancer by transcriptional activation of the K-ras gene[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(7): 3131-3139.
- [16] KIKUCHI S, KATADA N, SAKURAMOTO S, et al. Survival after surgical treatment of early gastric cancer: surgical techniques and long-term survival[J]. *Langenbecks Arch Surg*, 2004, 389(2): 69-74.
- [17] SHEN Y, WANG J, HAN X, et al. Effectors of epidermal growth factor receptor pathway: the genetic profiling of KRAS, BRAF, PIK3CA, NRAS mutations in colorectal cancer characteristics and personalized medicine[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e81628. DOI: 10.1371/journal.pone.0081628.
- [18] 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(3): 272-278.
- [19] KARAPETIS CS, KHAMBATA-FORD S, JONKER DJ, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer[J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(17): 1757-1765.
- [20] WPY H, SIAK PY, LLA I. Overview of current immunotherapies targeting mutated KRAS cancers[J]. *Curr Top Med Chem*, 2019, 19(23): 2158-2175.

(收稿日期: 2018-12-27, 修回日期: 2019-12-12)

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.04.018

◇ 临床医学 ◇

孕妇阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征对母婴结局的影响

孟文颖¹, 李小庆¹, 王雅丽¹

作者单位: 通州区妇幼保健院妇产科, 北京 101101

基金项目: 通州区妇幼保健院重点学科建设(KJ2016CX044)

摘要:目的 探讨孕妇阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征(OSAHS)对母婴结局的影响。方法 回顾性分析2016年1月至2017年1月于北京市通州区妇幼保健院产科建档的1 999例孕妇的临床资料。按照病情情况,其分为OSAHS组和非OSAHS组,OSAHS组593例,非OSAHS组1 406例,在妊娠第13周、28周及分娩前调查孕妇睡眠打鼾情况、测量孕妇生理生化指标,记录产后新生儿资料。比较两组的临床特征、孕妇分娩结局和新生儿结局。结果 OSAHS组的孕前体质量指数(BMI)高于非OSAHS组,产次低于非OSAHS组,均差异有统计学意义($P < 0.05$)。两组的年龄、孕次相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。OSAHS组孕妇的妊娠高血压综合征、慢性高血压、子痫前期、慢性高血压并发子痫前期、早产和妊娠糖尿病的发生率(5.23%、4.22%、7.25%、1.52%、24.79%、8.09%)明显高于非OSAHS组(1.99%、2.00%、1.49%、0.21%、14.44%、4.69%),差异有统计学意义($\chi^2 = 15.250, 21.091, 44.618, 11.885, 30.943, 149.164, P < 0.05$)。孕周[(30.18±4.02)周]明显少于非OSAHS组[(33.60±5.50)周],差异有统计学意义($t = 16.957, P < 0.05$)。两组的产后出血发生率相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。OSAHS组的新生儿窒息的发生率、Apgar评分<7分的比例(12.82%、3.36%)均明显高于非OSAHS组(4.62%、0.92%),差异有统计学意义($\chi^2 = 3.124, 3.295, P < 0.05$)。两组的新生儿体质量、巨大儿发生率、胎儿生长受限(FGR)发生率和脐带绕颈发生率相比,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 孕妇OSAHS与妊娠高血压综合征、慢性高血压、子痫前期、慢性高血压并发子痫前期、早产和妊娠糖尿病的发生密切相关,且会影响胎儿发育,应加强打鼾孕妇的围生期保健,改善母婴结局。

关键词: 睡眠呼吸暂停, 阻塞性; 打鼾; 妊娠并发症; 高血压, 妊娠性; 睡眠; 妊娠结局; 婴儿, 新生

Effect of obstructive sleep apnea hypopnea syndrome on maternal and infant outcome in pregnant women

MENG Wenying¹, LI Xiaoqing¹, WANG Yali¹

Author Affiliation: Department of Gynecology and Obstetrics, Maternal and Child Care Hospital of Tongzhou District, Beijing 101101, China

Abstract: Objective To explore the effect of obstructive sleep apnea hypopnea syndrome (OSAHS) on the outcome of pregnant women. **Methods** The clinical data of 1999 pregnant women registering at Department of Gynecology and Obstetrics, Maternal and