

doi:10.3969/j.issn.1671-038X.2018.01.09

外周血中 K-ras 和 p53 基因突变对胃癌术后复发转移的预测价值

李 明¹, 刘燕青², 胡鹏飞²

¹荆州市江陵县人民医院,湖北 荆州 434100;

²荆州市第一人民医院,湖北 荆州 434000)

摘要:[目的]探讨外周血 K-ras 和 p53 基因突变对胃癌根治术患者术后复发转移的预测价值。[方法]纳入 2010 年 1 月~2013 年 12 月于我院接受胃癌根治术的 107 例患者为对象,对其持续随访,并分别于化疗前后取外周血标本。另于 2017 年 3 月~5 月募集健康志愿者 38 例,取外周血标本。采用聚合酶链反应-单链构象多态性分析(PCR-SSCP)技术检测标本 K-ras 和 p53 基因突变情况。观察上述基因突变与胃癌患者临床病理特征及复发转移的关系。[结果]107 例患者中,共 54 例复发转移,发生率 50.47%;化疗前 p53 基因突变 30 例,占 28.04%,K-ras 基因突变 35 例,占 32.71%。健康志愿者均未能检出 p53 与 K-ras 基因突变。K-ras 与 p53 基因突变受化疗影响较轻,且与性别、年龄、手术方案等临床资料无明显关系($P>0.05$)。化疗前外周血中检出 p53 和 K-ras 基因突变的患者术后无病生存时间明显更短($P<0.05$),两基因突变均是患者术后复发转移的独立危险因素($OR=3.785, 2.983; P<0.05$)。化疗前 K-ras 基因突变对预测复发转移的敏感度 0.556、特异度 0.906;化疗前 p53 基因突变对预测复发转移的敏感度 0.481、特异度 0.924。[结论]胃癌根治术患者术后化疗前外周血中 K-ras 和 p53 基因突变检出率较高,且存在上述基因突变患者更易出现复发转移。

关键词:K-ras;p53;基因突变;胃癌;复发转移

中图分类号:R735.2

文献标志码:A

文章编号:1671-038X(2018)01-0048-06

Prognostic value of K-ras and p53 gene mutations in peripheral blood for postoperative recurrence and metastasis of gastric cancer

LI Ming¹, LIU Yan-qing², HU Peng-fei²

(¹Jiangling County People's Hospital, Hubei, Jingzhou 434100, China;²First People's Hospital of Jingzhou, Hubei, Jingzhou 434000, China)

Corresponding author: LI Ming, E-mail: limings25@163.com

Abstract:[Objective]To investigate the prognostic value of peripheral blood K-ras and p53 gene mutations for cancer recurrence and metastasis in patients with gastric cancer after radical resection. [Methods] 107 patients with gastric cancer treated with radical resection from January 2010 to December 2013 were involved and followed up. Their peripheral blood were sampled before and after chemotherapy respectively. In addition, 38 healthy volunteers were collected from March to May in 2017, whose peripheral blood samples were taken during medically examination. The K-ras and p53 gene mutations in specimens were detected by Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). The relationship between the gene mutation and clinicopathological features, recurrence and metastasis in patients with gastric cancer were observed. [Results] 54 out of the involved 107 cases were observed recurrence and metastasis, the incidence rate was 50.47%. Before chemotherapy, p53 gene mutation was found in 30 cases (28.04%). K-ras gene mutation was found in 35 cases (32.71%). No p53 and K-ras gene mutation was found in healthy volunteers. K-ras and p53 gene mutations were rarely affected by chemotherapy, and were not significantly related to gender, age, surgical protocol and other clinical data ($P>0.05$). Disease free sur-

收稿日期:2017-06-20

作者简介:李 明,男,本科,主治医师。研究方向:普外科

通讯作者:李 明, E-mail: limings25@163.com

vival time was significantly shorter in patients with p53 or K-ras gene mutation before chemotherapy($P<0.05$). These two mutations were independent risk factors for recurrence and metastasis after surgery($OR=3.785, 2.983; P<0.05$). The sensitivity and specificity for predicting recurrence and metastasis by K-ras gene mutation was 0.556 and 0.906, by p53 gene mutation was 0.481 and 0.924. **[Conclusion]** Patients with radical gastrectomy has a high detection rate of K-ras and p53 gene mutation in peripheral blood. K-ras and p53 gene mutations are predictors for the inclination of recurrence and metastasis.

Key words: K-ras; p53; Gene mutation; Gastric cancer; Recurrence and metastasis

胃癌为消化道常见恶性肿瘤,发病率及死亡率较高^[1],根治性手术是治疗该疾病的重要措施,但术后复发转移率较高,国内报道显示其术后复发转移率约为 44.55%~48.44%^[2-3],这会严重影响患者术后生存。针对消化系统恶性肿瘤的报道^[4]显示 K-ras 等基因突变与肿瘤的发生及发展有关,而胃癌根治术后复发转移又可能与肿瘤细胞释放入血有关。这提示术后检测患者 K-ras、p53 等基因突变,可能有助于早期发现肿瘤复发转移风险,以指导制定治疗计划,但仍需临床研究论证。本研究纳入胃癌根治术患者 107 例,开展持续随访研究,旨在探讨上述推论,报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

纳入 2010 年 1 月~2013 年 12 月于我院接受根治术治疗的 107 例胃癌患者为对象,开展前瞻性随访研究,本研究已获得院伦理委员会批准。107 例患者中:男 76 例,女 31 例;年龄 34~75 岁,平均(48.7±12.1)岁;贲门部肿瘤 28 例,胃体部肿瘤 33 例,胃窦部肿瘤 38 例,全胃肿瘤 8 例;根治性全胃切除术 32 例,胃大部切除术 75 例;淋巴清除采用 D1 式手术 36 例, D2 式手术 71 例;病理类型单纯腺癌 58 例,印戒细胞癌 8 例,粘液腺癌 4 例,混合型 37 例;参考第八版国际抗癌联盟胃癌分期手册^[5], TNM 分期 I B 期 7 例、II 期 12 例、III A 期 24 例、III B 期 28 例、III C 期 36 例;中高分化 38 例,低分化 69 例。为对比需要,另于 2017 年 3 月~5 月募集健康志愿者 38 例,其中男 24 例,女 14 例;年龄 35~75 岁,平均(48.1±13.1)岁。2 组性别、年龄差异无统计学意义($P>0.05$)。

1.2 纳入标准

患者纳入标准:于我院接受胃癌根治术,术中病理确诊为胃癌;病历及随访资料完整;TNM 分期 I~III 期;术后接受 EXLOX 方案辅助化疗;对本研究知情且签署同意书。健康志愿者纳入标准:年龄及性别与患者相匹配;表观正常,常规体检内容未检出任何异常;对本研究知情且签署同意书。

1.3 排除标准

患者排除标准:术前接受新辅助化疗或放疗;手术切缘为 R2 切除,病理诊断为肉瘤、间质瘤或淋巴瘤;术后辅助化疗前死亡;合并经血液传播的传染性疾病。健康志愿者未另设排除标准。

1.4 随访方法

所有患者术后修养 28 d,随后参考 XELOX 方案接受化疗,标准流程 6 周,其中 88 例完成全程辅助化疗;19 例患者未完成。术后对患者持续随访,每月 CT 复查 1 次,如提示复发转移,则进一步行 MRI、PET/CT、淋巴结穿刺活检等方案明确诊断,对确诊复发转移患者,以 CT 复查提示转移时间为转移发生时间,记录患者无病生存时间。研究截止时间 2017 年 5 月 31 日,患者随访时间 8~71 个月,平均(44.06±18.18)个月,分别于随访第 32 个月、41 个月、41 个月失访 3 例,占 28.04%。

1.5 检测方案

分别于所有患者辅助化疗前、88 例完成辅助化疗患者化疗后,对照组入组时,取外周血 5 ml,所有患者胃癌根治术中取门静脉血 5 ml,以乙二胺四乙酸抗凝,-20℃冻存。采用聚合酶链反应-单链构象多态性分析(polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism, PCR-SSCP)检查外周血 K-ras 和 p53 基因突变:①采用 Chelex-100 方法提取有核细胞 DNA。②PCR 扩增。反应体系:15 mmol/L 氯化镁 5 μl, 10×dNTP 5 μl, 上游及下游引物各 25 pmol, 基因组 DNA 1 μl, 以去离子水配置为 50 μl 进行反应。其中引物见表 1。反应条件:96℃预变性 7 min, 94℃下加入 Taq DNA 聚合酶 5 U, 94℃变性 40 s, 55℃退火 60 s, 72℃延伸 60 s, 循环 35 次, 72℃延伸 7 min。③扩增产物电泳, 鉴定产物质量。④扩增产物浓度调整至相同, 取 8 μl, 加入等量甲酰胺, 热变性、冰浴后, 银染并观察结果。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 19.0 处理数据,计数资料计算构成比,外周血中 K-ras 与 p53 基因突变在化疗前后的变化情况采用 McNemar 检验;K-ras 与 p53 基因突变与其它临床指标的关系采用 χ^2 检验评价;2 者与

患者复发转移的关系采用 *Kaplan-Meier* 分析评价;患者复发转移的独立危险因素采用 *Cox* 回归分

析。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 PCR 扩增引物序列

基因	引物序列	长度/bp
p53		
外显子 5-6	f:5'-GCAGTTCCTCTTCCTGCAGTACTC-3';r:5'-AACCAGACCTCAGGCGGCTCATAG-3'	410
外显子 7-8	f:5'-TGTTGTCTCCTAGGTTGGCTCTGACTA-3';r:5'-GTCCTGCTTGCTTACCTCGCTTAGTGC-3'	580
外显子 9	f:5'-CCTATCCTGAGTAGTGGT-3';r:5'-GTCCTGCTTGCTTACCTC-3'	165
K-ras		
外显子 1	f:5'-GTACTGGTGGAGTATTTGATAGTG-3';r:5'-AAGAATGGTCCTGCACCAGTAATA-3'	250
外显子 2	f:5'-AGGTGCACTGTAATAATCCAGACTGTG-3';r:5'-GCACTATAATTACTCCTTAATGTCAGC-3'	260
外显子 3	f:5'-GACTGAATATAAACTTGTGG-3';r:5'-CTCTATTGTTGGATCATATT-3'	108

2 结果

2.1 患者预后描述性统计

截至随访末期,107 例患者中,共 54 例复发转移,发生率 50.47%,其累积无病生存期见图 1。复发转移患者中 22 例确诊为局部复发,32 例确诊为远处转移。54 例复发转移患者中,53 例死亡,1 例截至随访末期仍存活;53 例未发现复发转移患者中,2 例因疑似自杀死亡,此 2 例患者不归入复发转移患者。

2.2 患者化疗前外周血 K-ras 和 p53 基因突变发生情况

凝胶电泳条带中 p53 条带位于 410 bp、165 bp 提示正常,其余提示突变,见图 2A,本研究 107 例患者化疗前检出 p53 基因突变 30 例,占 28.04%;健康志愿者均未能检出 p53 基因突变。K-ras 条带位于 260 bp、108 bp 提示正常,其余提示突变,见图 2B,本研究患者化疗前检出 K-ras 基因突变 35 例,占 32.71%;健康志愿者均未能检出基因突变。另:K-ras 与 p53 基因均突变患者 28 例,占 26.17%;K-ras 与 P53 基因任一脱变患者 37 例,占 34.58%。

2.3 化疗对外周血 K-ras 和 p53 基因突变的影响

对 88 例完成整个化疗周期的患者进行 *Mc-Nemar* 配对检验,结果显示化疗对外周血 K-ras 和 p53 基因突变无明显影响($P>0.05$),见表 2。由于

化疗前检测数据更完整,故后续分析均以化疗前

K-ras 和 p53 基因突变情况为准。经 *McNemar* 检验,化疗前后 K-ras 和 p53 基因突变发生情况均无明显变化($P>0.05$)。

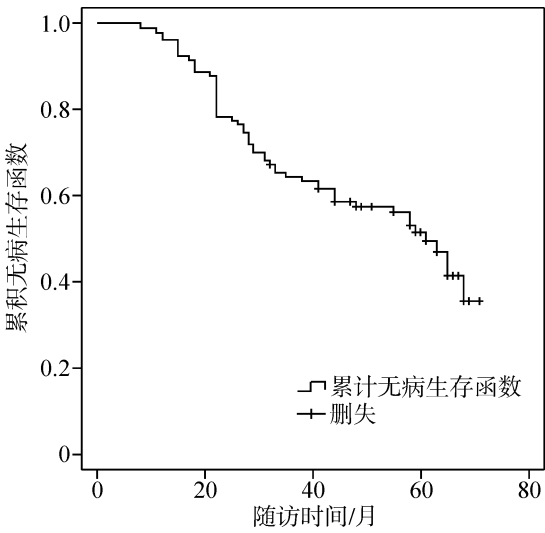
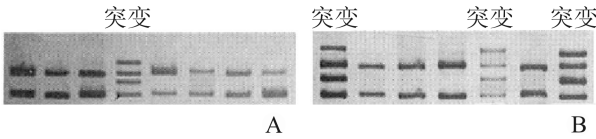


图 1 所有患者累积无病生存函数曲线



A:p53 基因;B:K-ras 基因

图 2 p53 与 K-ras 基因突变示意图

表 2 88 例患者化疗前后外周血 K-ras 和 p53 基因突变变化例(%)

化疗前	化疗后 K-ras 基因突变			化疗后 p53 基因突变		
	突变	未突变	总计	突变	未突变	总计
突变	28(31.82)	0(0.00)	28(31.82)	24(27.27)	0(0.00)	24(27.27)
未突变	2(22.73)	58(65.91)	60(68.18)	1(1.14)	63(71.59)	64(72.73)

总计	30(34.09)	58(65.81)	88(100.00)	25(28.41)	63(71.59)	88(100.00)
----	-----------	-----------	------------	-----------	-----------	------------

2.4 化疗前 K-ras 和 p53 基因突变与其它临床指标关系

经 χ^2 检验,K-ras 和 p53 基因突变均与性别、年龄、肿瘤部位、手术方案、淋巴清除方案、分化情况、TNM 分期无关($P>0.05$),见表 3。

2.5 化疗前外周血 K-ras 和 p53 基因突变对术后无病生存率的影响

外周血 p53 基因突变患者平均无病生存时间估计值(34.77 ± 3.40)个月,明显短于无突变患者(56.17 ± 2.39)个月,差异有统计学意义($Log\ rank\ \chi^2=24.172,P<0.01$);外周血 K-ras 基因突变患者平均无病生存时间估计值(39.29 ± 3.43)个月,明显短于无突变患者(56.27 ± 2.56)个月,差异有统计学意义($Log\ rank\ \chi^2=18.724,P<0.01$)。累积无病生存时间函数曲线见图 3。

2.6 患者术后复发转移的独立危险因素分析

纳入性别、年龄、手术类型、淋巴结清除方式、TNM 分期、肿瘤分化程度为协变量,以术后复发转移为因变量,经 Cox 回归分析显示 p53 基因突变和 Kras 基因突变均是复发转移的独立危险因素,见表 4。

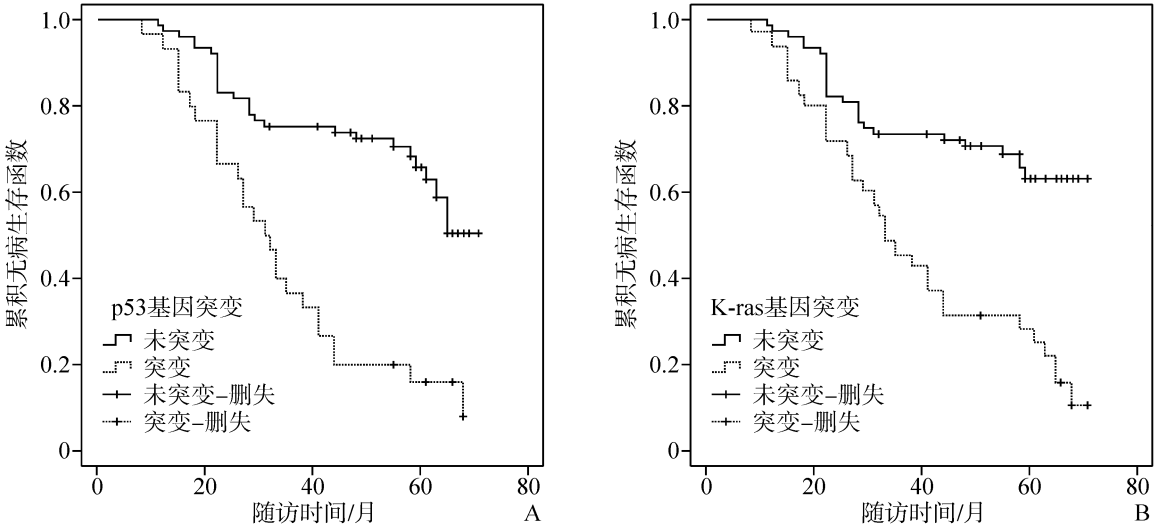
2.7 外周血 p53 与 K-ras 基因突变对术后复发转移的预测效能

30 例 p53 基因突变患者中,26 例复发;35 例 K-ras 基因突变患者中,30 例复发,见表 5。经 χ^2 检验,复发转移患者中 K-ras 与 p53 基因突变患者均明显高于无复发转移患者,差异有统计学意义($\chi^2=25.850,21.853$;均 $P<0.01$)。化疗前 K-ras 基因突变对预测复发转移的敏感度 0.556、特异度 0.906;化疗前 p53 基因突变对预测复发转移的敏感

度 0.481、特异度 0.924。

表 3 化疗前 K-ras 和 p53 基因突变与其它临床指标关系 例(%)

指标	例数	K-ras 突变	P53 突变
性别			
男	76	21(27.63)	18(26.68)
女	31	14(45.16)	12(38.71)
年龄/岁			
>60	58	20(34.48)	17(29.31)
≤60	49	15(30.61)	13(26.53)
肿瘤部位			
贲门部	28	9(32.14)	7(25.00)
胃体部	33	10(30.30)	10(30.30)
胃窦部	38	13(34.21)	11(28.95)
全胃	8	3(37.50)	2(25.00)
手术类型			
全胃切除	32	14(43.75)	11(34.38)
胃大部切除	75	21(28.00)	19(25.33)
淋巴结清除			
D1	36	14(38.89)	12(33.33)
D2	71	21(29.58)	18(25.35)
TNM 分期			
I B~II	19	4(21.05)	4(21.05)
III A~III C	88	31(35.23)	26(29.55)
分化情况			
中高分化	38	10(26.32)	8(21.05)
低分化	69	25(36.23)	22(31.88)



A:p53 基因;B:K-ras 基因

图 3 化疗前外周血 K-ras 和 p53 基因突变对术后无病生存率的影响

表 4 患者术后复发转移的独立危险因素分析

指标	β	标准误	Wald	P	OR(95%CI)
p53 基因突变	1.331	0.276	23.198	0.000	3.785(2.202~6.506)
K-ras 基因突变	1.093	0.367	8.873	0.003	2.983(1.882~5.711)

表 5 外周血 p53 与 K-ras 基因突变与术后复发转移的关系例(%)

复发转移	化疗前 K-ras 基因突变			化疗前 p53 基因突变		
	突变	未突变	总计	突变	未突变	总计
是	30(28.04)	24(22.43)	54(50.47)	26(24.30)	28(26.17)	54(50.47)
否	5(4.67)	48(44.86)	53(49.53)	4(3.74)	49(45.79)	53(49.53)
总计	35(32.71)	72(67.29)	107(100.00)	30(28.04)	77(71.96)	107(100.00)

3 讨论

胃癌患者术后高复发转移率使得患者生存率较低,本研究患者 5 年累积无病生存率 51.50%。龚巍巍等^[6]报道浙江省 2005~2010 年胃癌患者的 5 年累积观察生存率为 39.03%;一项日本的全国范围报道^[7]则提示随胃癌 TNM 分期的升高,患者 5 年累积存活率从 92.2%下降至 14.9%。可见,术后早期探明患者肿瘤复发转移风险,从而指导调整治疗方案,可能有助于提升患者预后。

近年研究认为肿瘤形成过程中存在基因形态的改变,这对指导开展更具靶向性的治疗方案有重要价值^[8]。且报道显示 p53 和 ras 基因在胃癌中存在高频率突变现象,其中 K-ras 基因突变与肿瘤早期恶性变有关,p53 突变则主要发生于胃癌中晚期^[9-10]。这提示如果癌细胞释放入血,可能能够于外周血中检出 p53 和 K-ras 基因突变,而癌细胞释放入血又与癌症术后复发转移有关,因此可进一步推测术后外周血中检出 K-ras 基因或 p53 基因突变者,更容易发生胃癌复发转移。本研究术后化疗前检出 p53 基因突变 30 例,占 28.04%,检出 K-ras 基因突变 35 例,占 32.71%,而健康志愿者均未能检出上述基因突变,说明胃癌的发生及发展可能确与 p53 或 K-ras 基因突变,这与既往报道^[11-12]结论相符。既往病理学研究^[13]主要于肿瘤组织中观察上述基因突变的情况,本研究结果则提示外周血中也能够检出上述基因突变情况,推测这与手术操作有关,也表明开展更为精准的术式,避免癌细胞及相关 DNA 碎片释放入血,可能有助于减少肿瘤术后复发转移发生率。

本研究发现术后外周血中检出 K-ras、p53 基因突变的比例不因化疗而变化,表明癌细胞在术后释放入血,在短时间内难以通过机体免疫功能自我清除,这为其转移奠定了基础。同时,K-ras、p53 基因

突变与 TNM 分期、肿瘤分化程度等指标无明显相关性,且本研究证实 2 因素是患者术后肿瘤复发转移的独立危险因素,而赵丹等^[14]报道则提示 TNM 分期也与患者术后肿瘤复发有关,Kang 等^[15]报道也指出多种临床病理因素与患者术后肿瘤复发转移有关,造成差异的机制可能是 K-ras 和 p53 对复发转移的影响机制掩盖了其它因素的作用有关,另外也可能与研究样本量有关,需要后续研究深入探讨。

本研究发现外周血中检出 K-ras、p53 基因突变者,其术后无病生存时间明显短于未检出上述基因突变者,且上述基因突变对预测患者术后复发转移的特异度极高,K-ras 基因突变预测复发转移的特异度 0.906,p53 基因突变为 0.924,这说明对胃癌根治术患者,术后检测外周血上述基因突变有重要意义,能够检出上述基因患者的复发转移率明显提升,需要重点关注。

综上,外周血中 K-ras 和 p53 基因突变对预测胃癌术后复发转移有极高的特异性,这对制定更具针对性的胃癌术后治疗方案有一定意义。

参考文献

[1] Karimi P, Islami F, Anandasabapathy S, et al. Gastric cancer: descriptive epidemiology, risk factors, screening, and prevention[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2014, 23(5):700-713.

[2] 张学伟, 郑安斌, 石炜, 等. 胃癌根治术后复发转移的影响因素及其对预后的影响[J]. 实用癌症杂志, 2015, 30(7):1062-1064.

[3] 陈舒晨, 张春东, 徐晓阳, 等. 胃癌组织 Ki-67 表达与复发转移相关性分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2014, 21(18):1423-1428.

[4] 刘珊, 程波, 钟善传, 等. 结直肠癌 K-ras 基因突变与 Ras、EGFR、p53 蛋白表达的相关性[J]. 诊断病理学杂志, 2014, 21(2):90-93.

[5] 陕飞, 李子禹, 张连海, 等. 国际抗癌联盟及美国肿瘤

联合会胃癌 TNM 分期系统(第 8 版)简介及解读[J]. 中国实用外科杂志, 2017, 37(1):15-17.

[6] 龚巍巍, 罗胜兰, 胡如英, 等. 2005-2010 年浙江省胃癌生存率分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2014, 36(8):636-639.

[7] Nashimoto A, Akazawa K, Isobe Y, et al. Gastric cancer treated in 2002 in Japan; 2009 annual report of the JGCA nationwide registry [J]. Gastric Cancer, 2013, 16(1):1-27.

[8] Walther W, Schlag PM. Current status of gene therapy for cancer. Curr Opin Oncol[J]. 2013, 25(6):659-664.

[9] van Grieken NC, Aoyama T, Chambers PA, et al. KRAS and BRAF mutations are rare and related to DNA mismatch repair deficiency in gastric cancer from the East and the West: results from a large international multicentre study[J]. Br J Cancer, 2013, 108(7):1495-1501.

[10] Busuttill RA, Zapparoli GV, Haupt S, et al. Role of p53 in the progression of gastric cancer[J]. Oncotarget, 2014, 5(23):12016-12026.

[11] 黄荧, 魏嘉, 刘宝瑞. K-ras 突变在胃癌预后及靶向治疗中的研究进展[J]. 中华肿瘤杂志, 2016, 38(2):81-85.

[12] 王晓龙, 张成武, 刘宁, 等. P53 基因 Arg72 Pro 单核苷酸多态性与青海地区人群胃癌易感性的相关性分析[J]. 中国免疫学杂志, 2014, 30(2):178-181.

[13] 徐燕, 蔡媛, 荆娟, 等. 胃癌组织中 HER2 基因及 p53 蛋白表达及其临床意义[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(24):4750-4752.

[14] 赵丹, 龚光伟, 李胜文, 等. 胃癌根治术后复发类型及影响因素分析[J]. 实用癌症杂志, 2013, 28(3):278-281.

[15] Kang WM, Meng QB, Yu JC, et al. Factors associated with early recurrence after curative surgery for gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(19):5934-5940.

医学论文英文摘要中作者署名与作者单位的书写规范

英文摘要是一篇可以离开论文而独立存在的短文,常被收录进数据库及文摘杂志,英文摘要与论文一样,应在其题名下方“列出全部著者姓名及其工作所在单位”。这是体现著者文责自负和拥有著作权的标志。如果只列出前 3 人,就等于剥夺了其著者的署名权,这是违反《著作权法》有关规定的。

作者姓名的写法:GB7714-87 规定,个人著者采用姓在前、名在后的著录形式。中国作者姓名按汉语拼音拼写。不同工作单位的作者姓名的右上角标以 1、2、3 等角码与下所注工作单位相对应。

作者的工作单位:作者的工作单位书写应遵照英美医学论文中小单位在前、大单位在后的习惯,在我国医学期刊中大多采用这种格式,在大学(University)的 2 级单位的书写上,有人建议学院和系应用 College of ..., School of ..., Faculty of, Department of来表示;三级单位的教研室用 Section of, Unit of来表示。但大多数医学期刊在表达 2 级和 3 级单位时,均用 Deptment of表示。除实词的首字母大写外,其余均小写。第一作者单位名称后写出所在省市名和邮政编码[工作单位所在地除直辖市、省会城市外还应冠以省名,省名与市(县)名之间用逗号“,”隔开],并在邮政编码后写出国名“China”。单位名称与省市名之间以及邮政编码与国名之间隔以逗号“,”;其他作者只需标注工作单位。