

结直肠癌 *KRAS* 基因突变阳性与 *P53* 及 *MCC* 基因的相关性研究

罗喜顺,王海鹏*,朱袞嘉,李盛国,龙祥恺,蒋世宇,张琪琦
桂林医学院第二附属医院 胃肠外科,广西 桂林 54199

【摘要】 目的 探究结直肠癌 *KRAS* 基因突变阳性与 *P53* 基因及 *MCC* 基因的相关性研究。方法 回顾性研究 2017 年 3 月至 2020 年 7 月于桂林医学院第二附属医院确诊为结直肠癌患者 89 例,将其中 26 例 *KRAS* 突变阳性患者纳入突变组,63 例 *KRAS* 突变阴性且无其他突变患者纳入未突变组。采用荧光定量 PCR Taqman-ARMS 探针法测定 *KRAS* 基因突变;免疫组织化学方法对 *P53* 基因、*MCC* 基因表达进行检测,比较组间的差异性与相关性。**结果** 通过对 89 例结直肠癌患者 *KRAS* 突变阳性率的分析,结果显示 26(29.21%)*KRAS* 突变阳性,未突变患者为 63(70.79%);结直肠癌 *KRAS* 阳性率为 29.21%;*KRAS* 突变组 *MCC* 突变阳性效率 6(23.08%)显著低于未突变组 27(42.86%)差异有统计学意义($P<0.05$);*KRAS* 突变组 *P53* 突变阳性效率 8(30.77%)著低于未突变组 40(63.49%)差异有统计学意义($P<0.05$);*KRAS* 突变与 *P53*、*MCC* 呈负相关。**结论** 结直肠癌 *KRAS* 突变与 *P53*、*MCC* 呈显著的负相关关系。

【关键词】 结直肠癌; *KRAS* 基因; *TP53* 基因; *MCC* 基因

Correlation between positive *KRAS* mutation and *P53* and *MCC* in colorectal cancer

Luo Xishun, Wang Haipeng*, Zhu Xijia, Li Shengguo, Long Xiangkai, Jiang Shiyu, Zhang Qiqi

Department of Gastrointestinal Surgery, the Second Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin Guangxi 54199, China

Corresponding author: Wang Haipeng, E-mail:215833387@qq.com

【Abstract】 Objective To explore the relationship between *KRAS* gene mutation and *P53* gene and *MCC* gene in colorectal cancer. **Methods** From March 2017 to July 2020, 89 patients with colorectal cancer in our hospital were retrospectively studied. Among them, 26 patients with positive *KRAS* mutation were included in the mutation group, and 63 patients with negative *KRAS* mutation and no other mutation were included in the non mutation group. The mutation of *KRAS* gene was detected by TaqMan arms probe, and the expression of *P53* gene and *MCC* gene was detected by immunohistochemistry. **Results** By analyzing the positive rate of *KRAS* mutation in 89 patients with colorectal cancer, the results showed that 26 (29.21%) patients with *KRAS* mutation were positive, 63 (70.79%) patients without *KRAS* mutation were positive, and the positive rate of *KRAS* mutation in colorectal cancer was 29.21%. The positive rate of *MCC* mutation in *KRAS* mutation group 6 (23.08%) was significantly lower than that in non mutation group 27 (42.86%), the difference was statistically significant ($P<0.05$); the positive rate of *P53* mutation in *KRAS* mutation group 8 (30.77%) was significantly lower than that in non mutation group 40 (63.49%), the difference was statistically significant ($P<0.05$); there was a significant negative correlation between *KRAS* mutation and *P53*, *MCC*. **Conclusion** *KRAS* mutation is negatively correlated with *P53* and *MCC* in colorectal cancer.

【Key words】 Colorectal cancer; *KRAS* gene; *TP53* gene; *MCC* gene

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是肠道高发的恶性肿瘤之一,近年来其发病率与致死率在全

基金项目:广西高校中青年教师科研基础能力提升项目(2020KY12021)

*通信作者:王海鹏, E-mail:215833387@qq.com

世界范围内高居恶性肿瘤第3位^[1]。结直肠癌的发生发展是一个多步骤、多阶段且复杂变化的生物学过程,多由于细胞内重要的调控基因受损,导致一系列信号传递系统出现故障^[2,3]。研究表明 *KRAS* 等癌基因的突变或激活和 *P53*、*MCC* 等抑癌

基因表达异常或缺失都与结直肠癌的发生、发展密切相关^[4,5]。结直肠癌由正常结直肠上皮向腺瘤和侵袭性癌的演变过程中将依次发生“APC-KRAS、MMR-P53”突变累积这一分子生物学模式, P53与MCC都是细胞生长过程中的负调节因子,与结直肠癌的发生密切相关^[6,7]。其中MCC基因突变被认为与结直肠癌早期的发生有关、P53基因突变被认为与结直肠癌晚期的发生有关^[8]。本研究通过对KRAS基因突变率的检测,以及P53基因、MCC基因的相关表达,研究KRAS基因突变与P53基因、MCC基因表达的相关性,进而探讨CRC发生的可能机制,也为CRC患者术后存活率提供新的方向。

1 资料与方法

1.1 研究对象 回顾性研究2017年3月至2020年7月于桂林医学院第二附属医院确诊为结直肠癌患者89例,将其中26例KRAS突变阳性患者纳入突变组,63例KRAS突变阴性且无其他突变患者纳入未突变组。纳入标准:①术后病理学确诊为结直肠癌^[9];②术前检查后1周内接受根治性手术治疗,淋巴清扫至肠系膜血管根部,肠系膜下动脉选择根部离断或保留左结肠动脉分支后离断,直肠远切缘距肿瘤至少2cm;③肿瘤边缘 ≥ 5 cm行KRAS基因检测。排除标准:①有原发性直肠癌外的其他腹腔疾病或相关血管相关疾病(如门静脉高压、血管狭窄、血栓或发育变异)。②合并严重糖尿病、高血压、感染者;合并肾、心、肝、肺等脏器功能严重障碍者及患有其他恶性肿瘤患者;③临床资料不完整。本研究经医学伦理委员会审核批准后执行,患者基线资料差异无统计学意义($P>0.05$)。如表1。

1.2 方法

1.2.1 KRAS突变基因的测定 采用荧光定量PCR Taqman-ARMS探针法测定KRAS基因突变,准备工作:高温消毒实验器材。总RNA提取:将Trizol裂解组织的混合液收集至灭菌的1.5ml EP管中,4℃,12 000 r/min,离心15 min。吸取上清液至另一灭菌的1.5ml EP管中。于上清液中加入200 μ l 氯仿,并盖紧管盖,剧烈充分振荡15~30 s,至乳化充分,无分相现象。室温静置5 min。4℃,12 000 r/min,离心15 min。于上清液中加入500 μ l 异丙醇,并盖紧管盖,正反颠倒EP管,混匀。室温静置10 min,

4℃,12 000 r/min,离心15 min。去除EP管,仔细观察管底部是否有微小的白色沉淀,即总RNA。用75%乙醇洗涤RNA,去除上清液,小心沿管壁加入75%乙醇1 ml/管。轻轻上下翻动EP管,使沉淀从管壁脱落。4℃,12 000 r/min,离心5 min。弃掉上清液,以滤纸吸干管口乙醇,开盖晾干。加入DEPC水30 μ l/管。融解RNA。用紫外分光光度计测定OD260与OD280,并计算OD260与OD280比值,筛选比值在1.8~2.0的样本用于后续实验。RNA浓度计算。按下列公式计算RNA浓度。

$$\text{RNA 浓度}(\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{\text{OD260} \times 40 \times \text{稀释倍数}}{1000}$$

配置RT-PCR反应液及琼脂糖凝胶。首先,安装好制胶架和梳子;然后称取琼脂糖1.5 g,用100 ml电泳缓冲液溶解,微波炉中加热2 min至沸腾,取出后冷却至50℃左右,加入缓冲液,调节终浓度为0.5 μ g/ml;最后将加入染料的琼脂糖凝胶倾倒入制胶架内,室温凝固20 min,垂直拔掉梳子,将琼脂糖凝胶转移至水平电泳槽内,加入电泳缓冲液,使液面与凝胶面齐平,梳子孔中充满电泳缓冲液。将扩增产物按照5:1加入6 \times 上样缓冲液,混匀,每孔加入5 μ l进行电泳。电泳仪参数设定为80 V,60 min,恒压电泳,电泳过程中随时观察溴酚蓝电泳位置,跑至凝胶边缘立即停止电泳。测序反应及纯化:向新的0.2 ml的EP管中加测序试剂1 μ l、酶解产物2 μ l和引物2 μ l进行PCR扩增,扩增条件为变性96℃ 1 min循环1次,96℃ 10 s 50℃ 5 s 60℃ 2 min循环25次,25℃ 1 min循环1次。加醋酸钠-乙醇混合物16 μ l(醋酸钠:乙醇=1:15)并剧烈振荡,避光静置15 min后12 000 r/min以上4℃离心30 min,吸弃上清液。加预冷70%乙醇70 μ l,剧烈振荡,12 000 r/min以上4℃离心15 min后吸弃上清液。温和颠倒数次混匀后12 000 r/min以上4℃离心5 min后吸弃上清液。加预冷70%乙醇70 μ l,温和颠倒数次混匀后12 000 r/min以上4℃离心5 min后吸弃上清液。室温放置30 min让酒精在室温挥发干净,加入去离子甲酰胺溶解DNA。PCR变性:95℃ 4 min,4℃ 4 min。向96孔板内移液,每孔加11 μ l,避免孔内出现气泡。

1.2.2 P53及MCC的测定 采用免疫组织化学方法对P53蛋白、MCC蛋白表达进行检测。将固定好的组织块取出,用自来水流水充分冲洗,冲洗后经

全自动脱水机进行脱水。随后进行透明、浸蜡、包埋,进行切片。展片时水温维持在45℃左右,用针头挑取蜡带,放在30%乙醇溶液的水面上,使切片展开。将切片架置于60℃干燥箱中烘烤2h,至切片上的蜡熔化。烤片后,将切片架置入盛有二甲苯的样本瓶中,经过二甲苯I、II脱蜡各20min,然后再逐级放入梯度乙醇中,浓度由高及低,分别为100%、95%、90%、80%、70%,每个浓度乙醇浸泡5min,最后放入蒸馏水中浸泡5min。染色:①将盛有柠檬酸缓冲液的烧杯放于电子万用炉上方加热,至沸腾,放入切片,小火维持沸腾状态20min,以达到抗原修复的目的。②抗原修复后,冷却至室温,将载玻片转移至湿盒中,以PBS冲洗3次,然后于组织薄膜上滴加正常山羊血清,封闭10min。③去除封闭液,勿洗。分别滴加P53、MCC一抗工作液(1:300稀释),4℃孵育过夜。④PBS洗涤,5min/次,洗涤5次。⑤滴加二抗工作液(1:500稀释),37℃恒温水浴锅中孵育90min。⑥PBS洗涤,5min/次,洗涤5次。⑦滴加DAB显色液,室温孵育1~10min,需随时观察染色情况,将载玻片置于白色背景上方,观察染色良好后,终止显色。⑧PBS缓冲液洗涤,5min/次,洗涤5次。⑨苏木素染色液复染30~60s。自来水充分冲洗。随后进行封片、照片采集。

1.3 统计学处理 采用SPSS 26.0及GraphPad 8.0软件包对数据与图形处理。首先,采用Kolmogorov-Smirnov检验与Levene检验判断数据的正态性与方差齐性。计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,组间比较采用独立样本 t 检验;计数资料采用例(%)表示,组间比较采用卡方检验;采用Spearman对统计资料相关性进行分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 突变组与未突变组一般资料比较 突变组与未突变组在年龄、性别、体质量指数、癌变部位、组织学类型、分化程度、TNM分期、淋巴结转移方面差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表1。

2.2 结直肠癌KRAS阳性率 26例(29.21%)KRAS突变阳性,未突变患者为63例(70.79%);结直肠癌KRAS阳性率为29.21%。

2.3 KRAS突变组与未突变组P53阳性率的比较 KRAS突变组P53突变阳性效率8例(30.77%)显著低于未突变组40例(63.49%),差异有统计学意

义($P<0.05$)。见表2。

2.4 KRAS突变组与未突变组MCC阳性率的比较 KRAS突变组MCC突变阳性效率6例(23.08%)显著低于未突变组27例(42.86%),差异有统计学意义($\chi^2=4.064, P=0.044$)。

2.5 KRAS突变与P53、MCC相关性研究 通过对KRAS突变与P53、MCC相关性分析,结果显示KRAS突变与P53、MCC呈负相关关系。见表3。

3 讨论

近年来结直肠癌的发病率与致死率在全世界范围内居恶性肿瘤第3位,且男女发病率大体相同,以北美洲及大洋洲多发,在我国东南沿海地区

表1 研究对象基线资料比较

基线资料	突变组 (n=26例)	未突变组 (n=63例)	χ^2/t 值	P值
年龄($\bar{x}\pm s$,岁)	57.12±8.40	58.71±9.02	2.783	0.062
性别(例)			0.152	0.697
男	12	31		
女	14	32		
体质量指数($\bar{x}\pm s$,kg/m ²)	23.81±2.09	24.10±2.12	2.671	0.121
癌变部位(例)			0.429	0.513
结肠癌	18	39		
直肠癌	8	24		
组织学类型(例)			0.630	0.427
腺癌	21	55		
黏液腺癌	5	8		
分化程度(例)			0.192	0.908
高分化	6	12		
中分化	12	30		
低分化	8	21		
TNM分期(例)			0.262	0.609
I~II期	15	40		
III~IV期	11	23		
淋巴结转移(例)			0.008	0.930
有	6	14		
无	20	49		

表2 KRAS突变组与未突变组P53阳性率的比较(例)

组别	P53		χ^2 值	P值
	阳性	阴性		
突变组	8	18	6.665	0.010
未突变组	40	26		

表3 KRAS突变与P53、MCC相关性研究

指标	KRAS突变	
	r值	P值
P53	-0.782	0.006
MCC	-0.766	0.032

多发^[10]。结直肠癌容易发生转移,而且预后效果严重影响人民的生存质量,因此,各国专家在不断地寻找结直肠癌的发病原因及其机制。有关结直肠癌发病的大体原因分为环境学说、遗传基因学说、高危因素学说^[11,12]。近年来,遗传与基因学说是结直肠癌病因的研究重点。结直肠癌的发生发展是一个多步骤、多阶段且复杂变化的生物学过程,多由于细胞内重要的调控基因受损,进而导致一系列信号传递系统出现故障^[13,14]。该生物学过程多包括周围环境或危险因素激活某种癌基因、体内某些变化进而导致抑癌基因的失活以及受到外界因素刺激后导致错配修复基因突变等^[15]。多项研究表明 *KRAS* 等癌基因的突变或激活与 *P53*、*MCC* 等抑癌基因表达异常或缺失与结直肠癌的发生、发展密切相关^[12,14]。*KRAS* 基因主要在大肠部位表达,*KRAS* 基因突变,蛋白结构发生改变,失去原来的信号转导途径,进而促进细胞异常分化、增殖,甚至发生恶变,与结直肠癌的发生及预后有着很密切的关联。其最为常见的突变方式为点突变,即 *KRAS* 基因的 exon1 出现突变,导致其与之前拼接方式出现不同,与该蛋白结合的第 188 或 189 位氨基酸发生相应变化,与 GTP 结合后对原有的信号通路不应答或失活,进而导致细胞不受控的恶变,被认为是与结直肠癌发生的最重要一步^[16]。本研究通过对 89 例结直肠癌患者 *KRAS* 突变阳性率的分析,结果显示 26 例(29.21%)*KRAS* 突变阳性,未突变患者为 63 例(70.79%),Spearman 相关性分析发现 *KRAS* 突变与 *P53*、*MCC* 呈负相关。

P53 是细胞生长过程中的负调节因子,与结直肠癌的发生密切相关。*MCC* 基因突变被认为与结直肠癌早期的发生有关,*P53* 基因突变被认为与结直肠癌晚期的发生有关。*P53* 基因分为野生型与突变型两种类型,野生型是作为抑癌基因对癌细胞的终末分化具有负调节作用,进而维持细胞的稳定,诱导细胞的正常凋亡,其蛋白在细胞中表达较少;若突变型在细胞中过度表达,导致细胞的正常生理周期被破坏,进而激活某些癌基因,使正常细胞进入到不正常的分化周期中,无限生长、繁殖,且淋巴转移程度更高,由于突变导致蛋白构象改变,如用免疫组织化学等方法检测,可以检测出突变基因蛋白的表达情况,故其作为结直肠癌的恶性程度高的标志之一^[17]。通过对 *KRAS* 突变组与未突变组 *P53* 阳性率的比较,结果显示,

KRAS 突变组 *P53* 突变阳性率 30.77% 低于未突变组 63.49%,差异有统计学意义($P<0.05$)。

MCC 基因同样作为一种抑癌基因,可以控制调节肿瘤细胞的生长,主要表达在细胞的细胞质、细胞核及骨架之中,同样在细胞的生长与分化中起到重要作用。*MCC* 基因的杂合子丢失以及 *MCC* 基因突变与结直肠癌有关,*MCC* 基因突变位于 5q21 号染色体上,其突变常常会导致近 80% 的锯齿状息肉产生以及近 50% 的散发性结直肠癌发生。这表明 *MCC* 基因沉默是结直肠癌早期发展的重要因素。*MCC* 基因在早期很小范围的腺癌组织中即可以检出^[18]。*MCC* 基因在蛋白翻译后对细胞内 E-钙黏蛋白进行抑制作用,后者与微环境相互作用,形成细胞 E-钙黏蛋白黏附复合物,进而控制正常细胞的正常分化与增殖,使得 *MCC* 基因甲基化高度表达,加快淋巴转移,并同时使得肿瘤呈低分化趋势发展。本研究通过对 *KRAS* 突变组与未突变组 *MCC* 阳性率的比较情况,结果显示,*KRAS* 突变组 *MCC* 突变阳性率 23.08% 显著低于未突变组 42.86%,差异有统计学意义($P<0.05$)。

综上所述,通过对 *KRAS* 基因突变率的检测,及 *P53* 基因、*MCC* 基因相关表达情况的研究,结果显示 *KRAS* 突变与 *P53*、*MCC* 呈负相关。

参考文献

- [1] 李慧馨,卢实春,杨占宇,等. *KRAS* 基因突变对结直肠癌肝转移患者长期预后的影响及临床相关因素研究[J]. 中华肝胆外科杂志,2020,26(5):326-329.
- [2] 李艳艳,高静,吉聪聪,等. 结直肠癌 *KRAS*、*NRAS* 和 *BRAF* 基因罕见突变类型及其临床意义(附 1513 例)[J]. 中华消化外科杂志,2020,19(3):315-323.
- [3] 谢明智,李科志,利基林,等. 结直肠癌 *KRAS* 和 *BRAF* 基因突变及其与临床病理的相关性[J]. 广东医学,2019,40(8):1128-1131.
- [4] 李鹤. 结直肠癌分子与临床病理特征及无进展生存期的关系分析[D]. 郑州大学,2019.
- [5] 刘颖. 55 例原发性阑尾恶性肿瘤的 *KRAS*、*BRAF* 及 *MSI* 基因突变与临床表型及预后的分析[D]. 郑州大学,2019.
- [6] 朱凤伟,吕亚莉,钟梅等. 423 例结直肠癌 *KRAS*、*NRAS*、*BRAF*、*PIK3CA* 基因突变与临床病理的关系分析[J]. 解放军医学院学报,2019,40(10):976-980.
- [7] 刘菊林,李静,陈军等. 错配修复蛋白和 p53 蛋白在结直肠癌中的表达及其临床意义[J]. 胃肠病学,2020,25(1):28-32.
- [8] 焦俊霞,叶晓霞. EGFR、P53、Ki-67 在结直肠癌中表达及临床病理学意义 [J]. 中国老年学杂志,2020,40(10):2065-2068.
- [9] 施一翔,刘敬禹,江旭等. Ki-67、p53 及拓扑异构酶-II 对结

- 直肠癌肝转移患者预后的价值[J].海军医学杂志,2020,41(1):51-55.
- [10] 温祥,张建筑,彭晓峰等.结直肠癌错配修复蛋白和 p53 蛋白表达的临床意义及其相关性分析 [J]. 临床医学研究与实践,2020,5(30):40-43.
- [11] LUO Q, CHEN D, FAN X, et al. KRAS and PIK3CA bi-mutations predict a poor prognosis in colorectal cancer patients: A single-site report[J]. *Transl Oncol*, 2020,13(12):100874.
- [12] KIM D, XUE JY, LITO P, et al. Targeting KRAS(G12C): From Inhibitory Mechanism to Modulation of Antitumor Effects in Patients[J].*Cell*, 2020, 183(4):850-859.
- [13] Another KRAS Inhibitor Holds Its Own [J]. *Cancer Discov*, 2020, 10(12):OF2.
- [14] KIM KO, PARK WJ, JUNG Y, et al. Chemotherapeutic effects of MEK kinase inhibitor and BRAF kinase inhibitor onKRAS-mutated human colon cancer cell lines with different microsatellite instability [J]. *J Chemother*, 2020, 32(8):437-444.
- [15] BICH NGOC TT, HOAI NGA NT, MY TRINH NT, et al. Elephantopus mollis Kunth extracts induce antiproliferation and apoptosis in human lung cancer and myeloid leukemia cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 2020,263:113222.
- [16] HOU Y, HOU L, LIANG Y, et al. The p53-inducible CLDN7 regulates colorectal tumorigenesis and has prognostic significance[J]. *Neoplasia*, 2020,22(11):590-603.
- [17] CHO YH, RO EJ, YOON JS, et al. 5-FU promotes stemness of colorectal cancer via p53-mediatedWNT/-catenin pathway activation[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1):5321.
- [18] PAK JN, JUNG JH, PARK JE, et al. p53 dependent LGR5 inhibition and caspase 3 activation are critically involved in apoptotic effect of compound K and its combination therapy potential in HCT116 cells [J]. *Phytother Res*,2020,34(10): 2745-2755.