

新型纳米探针检测血浆 *K-ras* 基因突变与胰腺癌根治术后复发的关系研究

王晓光, 宋政炜, 倪全法, 陈 飞, 钟征翔

(嘉兴医学院附属第二医院, 浙江 嘉兴 314000)

摘要: [目的] 建立纳米捕获探针体系检测血浆中 *K-ras* 基因突变的方法, 并探讨 *K-ras* 基因单核苷酸多态性突变与胰腺癌根治术后复发及预后的关系。[方法] 收集 2013 年 1 月至 2016 年 1 月收治的胰腺癌根治性切除患者 51 例, 抽提外周血 DNA, 应用特异性纳米捕获探针检测 *K-ras* 基因 12、13 位点密码子突变, 通过 Kaplan-Meier 生存分析, 评估 *K-ras* 基因点突变对胰腺癌根治术后复发及预后的影响。[结果] 51 例胰腺癌根治术患者 *K-ras* 基因突变率为 35.3% (18/51), *K-ras* 突变与淋巴结转移、神经侵犯有显著性相关 ($P=0.002$, $P=0.004$)。通过随访分析 *K-ras* 基因突变者 1 年、2 年累积无瘤生存率为 41.3%、0%, *K-ras* 基因野生型 1 年、2 年累积无瘤生存率为 66.3%、14.4%, 差异有统计学意义 ($P=0.042$, $P=0.008$); *K-ras* 基因突变者 1 年累积总体生存率为 81.1%, 野生型为 93.5%, 差异无统计学意义 ($P=0.203$), 而 *K-ras* 基因突变者 2 年累积总体生存率为 11.7%, 野生型为 26.4%, 差异有统计学意义 ($P=0.035$)。[结论] 纳米捕获探针体系能够快速微量检测血浆中 *K-ras* 基因突变, 其与胰腺癌的淋巴结转移、神经侵犯密切相关, 可作为判断胰腺癌根治术后患者无瘤生存期的一个重要指标。

关键词: 胰腺癌; 复发; 突变; 磁性纳米粒子

中图分类号: R735.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2018)01-0047-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2018.01.B010

Relationship Between Recurrence Following Curative Resection of Pancreatic Cancer and *K-ras* Mutations in Plasma Detected by Novel Nano Probe

WANG Xiao-guang, SONG Zheng-wei, NI Quan-fa, et al.

(The Second Affiliated Hospital of Jiaxing College of Medicine, Jiaxing 314000, China)

Abstract: [Objective] To establish a method of detection *K-ras* mutations in plasma by a nano capture probe system, and to explore the relationship between recurrence or prognosis following curative resection of pancreatic and *K-ras* single nucleotide polymorphism mutations. [Methods] The plasma samples of 51 patients with pancreatic cancer who underwent curative resection were collected from January 2013 to January 2016. The DNA were extracted from all plasma samples and were detected for the codon 12 and 13 mutation of *K-ras* gene by nano capture probe. The effect of *K-ras* gene point mutations on recurrence and prognosis following curative resection of pancreatic cancer was assessed by the Kaplan-Meier survival analysis. [Results] The total *K-ras* mutation rate of pancreatic cancer patients was 35.3% (18/51). There were significant correlation between *K-ras* gene mutation and lymph node metastasis and neural invasion ($P=0.002$, $P=0.004$). The cumulative one-year and two-year actuarial recurrence free survival rates of patients with *K-ras* mutation were 41.3% and 0%, and the cumulative one-year and two-year actuarial recurrence free survival rates of patients with wild genotype were 66.3% and 14.4%, the differences are statistically significant ($P=0.042$, $P=0.008$). The cumulative one-year overall survival rate of patients with *K-ras* mutation was 81.1%, the rate of *K-ras* wild genotype was 93.5%, there was no difference in statistics ($P=0.203$). The cumulative two-year overall survival rate of patients with *K-ras* mutation was 11.7%, the rate of *K-ras* wild genotype was 26.4%, the difference was statistically significant ($P=0.035$). [Conclusion] The nano capture probe system could certainly detect *K-ras* mutation in rare plasma DNA. *K-ras* mutation in plasma is related to lymph node metastasis and neural invasion of pancreatic cancer, and *K-ras* mutation in plasma DNA is a predictive biomarker for disease-free survival after surgery for pancreatic cancer.

Subject words: pancreatic cancer; recurrence; mutation; magnetic nanoparticles.

胰腺癌恶性程度高、预后极差, 其 5 年生存率仅

为 8%^[1]。胰腺癌目前约占全部恶性肿瘤的 2%~3%, 且发病率逐年上升。手术切除目前仍是延长生存期的最有效手段, 但根治术后复发和转移是其死亡的主要原因, 术后 5 年生存率也仅为 13%~25%^[2]。因

基金项目: 浙江省科技厅公益技术研究社会发展项目 (2014C33139)
通讯作者: 钟征翔, 副院长, 主任医师, 本科; 嘉兴医学院附属第二医院肝胆外科, 浙江省嘉兴市环城北路 1518 号 (314000); E-mail: 13505739209@139.com

收稿日期: 2017-04-18; **修回日期:** 2017-09-12

此,进一步探索新的实验室标志物来预测胰腺癌根治术后的转移和复发是提高胰腺癌疗效亟待解决的问题。

随着临床分子生物学技术的发展,检测肿瘤相关基因已经成为胰腺癌早期诊断及预后评估研究的重要课题之一,而鼠类肉瘤病毒癌基因(kirsten rat sarcoma viral oncogene, *K-ras*) 突变检测作为辅助胰腺癌诊断的一项重要指标,已经在临床实验室中广泛进行研究,检测物包括细针穿刺物、胰液、胆汁、血液及粪便等^[3,4]。本研究拟设计新型纳米捕获探针体系高通量检测患者血浆 *K-ras* 基因 12、13 密码子点突变情况,并结合临床资料分析评估血浆 *K-ras* 突变对胰腺癌根治术后复发及预后判断的价值。

1 资料与方法

1.1 研究对象

2013 年 1 月至 2016 年 1 月住院收治的可切除胰腺癌患者 51 例,其中男性 29 例,女性 22 例,年龄 36~79 岁,平均年龄 66.8 岁,肿瘤位于头颈部 34 例,体尾部 17 例。所有患者均经手术病理明确诊断,术后 2 年内每 3 个月复查,2 年后每 6 个月复查,术后常规复查上腹部增强 CT、胸部 CT 及肿瘤指标等,所有病例均有完整的随访资料。所有患者均签署知情同意书,经伦理委员会批准。

1.2 血浆 DNA 抽提及鉴定

采集患者术前一天外周静脉血 5ml 于抗凝管中,采血后立即放 4℃ 冰箱保存,并于 12h 内离心,取上清后冻于 -80℃ 冰箱保存。血浆游离 DNA 提取采用美国 Omega 公司的试剂盒,并根据说明操作,提取完成后测定 DNA 浓度及 OD260/OD280 数值并冻于 -20℃ 冰箱保存。

1.3 纳米捕获探针体系的建立

1.3.1 采用水热合成法合成磁性纳米粒子

在氩气环境中,将 0.01mol/L 水杨酸水溶液加入三角烧瓶中,NaOH 调节 pH 值至 11.0,按照 Fe 离子浓度摩尔比例 2:1 比例加入 Fe_3O_4 和 Fe_2O_3 。充分混匀后,加热至 90 度,反应 4h。4000r/min 离心纯化 3 次,透射电镜测定其物理形貌,为均一的直径为 30nm 的磁性纳米粒子(Figure 1)。

1.3.2 制备链接有 *K-ras* 捕获探针的磁性纳米粒子

将合成的磁性纳米粒子用 DEPC 水稀释至

1μmol/L,与浓度 10μmol/L *K-ras* 基因突变(G12V or G13D)特异性捕获探针混合,加入 50μmol/L EDC 交联剂,室温反应 2h,磁性分离,重新分散于 TE 缓冲液钟。

1.4 血浆 *K-ras* 基因突变的检测

将 DNA 样本 2μl(约 20~40ng),加入 20μl PCR 反应体系,内含上下游引物、抑制剂、检测探针浓度分别为 0.9、0.9、0.9、0.2mmol/L。反应条件:95℃ 10 min,95℃ 20s,60℃ 45s,反应 40 个循环。由仪器自带软件获取 Ct 值,以荧光 Ct 值 15 为基线,以 *K-ras* 突变阳性的结肠癌细胞株 SW480DNA 提取样本为阳性对照,其荧光 Ct 值为 20,故取荧光 Ct 值 >20 为突变型,介于 15~20 之间为野生型,<15 为无效标本,需重新检测。

1.5 统计学处理

应用 SPSS19.0 统计软件包对资料进行统计学分析。计量资料采用 *t* 检验,计数资料采用 χ^2 检验,生存分析从手术当日开始统计无瘤生存期、总生存期及肿瘤复发情况,采用 Kaplan-Meier 法分析生存情况。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血浆 *K-ras* 基因突变及其与胰腺癌临床病理因素的关系

所有样本血浆 DNA OD260/OD280 比值在 1.8~2.0 之间,DNA 浓度为 20~200ng/μl,符合实验要求。

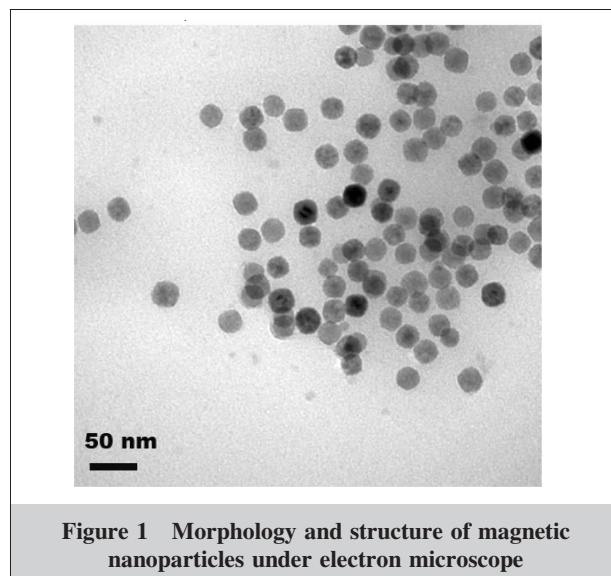


Figure 1 Morphology and structure of magnetic nanoparticles under electron microscope

所有病例纳米捕获探针荧光值均大于 15,均为有效检测样本,其中检出 18 例胰腺癌患者有 *K-ras* 突变(Ct 值:22.8~34.2),突变检出率为 35.3%,其中 12 位点突变 16 例,13 位点突变 2 例,余 33 例为野生型(Ct 值:15.8~19.3)。胰腺癌患者血浆 *K-ras* 突变与淋巴结转移及神经侵犯相关,与性别、年龄、有无临床症状、肿瘤直径、病理类型、血 CA199 水平及 TMN 分期等临床因素无相关性(Table 1)。

2.2 胰腺癌根治术后复发、预后情况

胰腺癌根治术共 51 例,胰腺癌患者通过门诊或电话进行随访,随访截止至 2016 年 6 月 31 日,平均随访时间 15.4 个月(5~29 个月),无一例患者失访。共有 34 例出现复发,其中局部复发占 44.1%(15/34),远处转移(包括肝、肺、肾等)占 32.3%(11/34),同时出现局部复发与远处转移占 23.5%(8/34)。患者无瘤中位生存时间为 13 个月(95%CI:10.9~15.1),1 年、2 年累积无瘤生存率分别为 57.1%、9.3%。而总体中位生存时间为 17 个月(95%CI:15.4~18.5),1 年、2 年累积总生存率分别为 89.3%、21.5%。截止随访时间 34 例复发患者中 28 例死亡,死亡病例从复

发至死亡的平均时间为(4.6±1.9)个月。

2.3 *K-ras* 基因突变与生存率

K-ras 基因突变组 1 年无瘤生存率分别为 41.3%,野生型组为 66.3%($\chi^2=4.150, P=0.042$),*K-ras* 基因突变组 2 年无瘤生存率 0%,野生型组为 14.4%($\chi^2=6.974, P=0.008$);同时 *K-ras* 基因突变组 1 年总生存率 81.1%,野生型组为 93.5%($\chi^2=1.621, P=0.203$),*K-ras* 基因突变组 2 年总生存率 11.7%,野生型组为 26.4%($\chi^2=4.443, P=0.035$)。

3 讨论

胰腺癌是恶性程度最高的肿瘤之一,目前手术治疗是最有效的方法,随着外科技术和围手术期处理手段的改进,胰腺癌手术切除的疗效已获较大提高,在世界各地大型综合医院中其手术死亡率及并发症发生率均大幅降低。但术后复发和转移仍是制约胰腺癌预后的主要问题,探讨术后早期复发和转移的相关因素,有助于制订相应临床治疗措施。既往研究报道,胰腺癌的复发、预后与 KPS 分值、血浆谷

Table 1 Relationship between *K-ras* gene mutation and clinicopathological parameters of pancreatic cancer

Clinical indicators		N	<i>K-ras</i> gene 12/13 point mutation		χ^2	P
			Yes	No		
Gender	Male	29	11	18	0.651	0.205
	Female	22	7	15		
Age		51	66.67±10.25	67.14±11.80	0.828	0.193
clinical Symptom	Yes	22	8	14	0.889	0.019
	No	29	10	19		
Site	Head/neck	34	11	23	0.534	0.386
	Body/tail	17	7	10		
Diameter(cm)		51	4.18±1.14	3.91±1.19	0.379	0.807
Pathological type	Adenocarcinoma	46	16	30	1.000	0.000
	Squamous cell carcinoma	5	2	3		
Lymph node metastasis	Yes	17	11	6	9.659	0.002*
	No	34	7	27		
Vascular invasion	Yes	23	9	14	0.603	0.270
	No	28	9	19		
Nerve invasion	Yes	23	13	10	8.266	0.004*
	No	28	5	23		
TMN stage	I A	6	3	3	2.217	0.539
	I B	14	3	11		
	II A	14	6	8		
	II B	17	6	11		
Chemotherapy	Yes	41	14	27	0.728	0.121
	No	10	4	6		

(t test or χ^2 test, $P<0.05$ was statistically significant difference)

胺酰转肽酶水平以及肿瘤 TMN 分期等临床指标相关,但这些临床指标均不能全面有效地评估和预测胰腺癌的复发及预后^[5],故亟需探索发现新的肿瘤生物分子学指标有效预测胰腺癌的复发和预后。

胰腺癌的发生、发展往往需要控制细胞分化、增殖和凋亡的多个相关基因参与,包括原癌基因 *K-ras* 点突变, *Her-2*、*EGFR* 过度表达和抑癌基因 *p53*、*p16* 等的失活,而 *K-ras* 基因是目前研究最多,与胰腺癌关系最为密切的原癌基因之一^[6]。*K-ras* 基因突变后激活构成癌基因,其表达产物 *ras* 蛋白发生构型改变,活化状态的 *ras* 蛋白通过 *ras-raf-MEK-MAPK* 细胞信号转导途径,造成细胞不可控制的增殖、恶变,同时研究发现该信号转导途径与癌细胞的侵袭力相关^[7]。既往有研究亦报道血浆中 *K-ras* 基因状态与胰腺癌的预后密切相关,*K-ras* 12 位点突变者中位生存时间为 3.9 个月,而野生型中位生存时间为 10.2 个月,血浆 *K-ras* 可能成为胰腺癌预后评估的重要指标^[8]。

本研究采用新型纳米捕获探针体系检测胰腺癌患者血浆中 *K-ras* 基因突变,该方法采用磁性纳米粒子富集标的 DNA 片段,再利用基于能量共振转移原理的纳米捕获探针特异识别相应单碱基突变,实现对 *K-ras* 基因 12、13 位点突变的高通量检测,通过这种敏感的实验手段使胰腺癌患者血浆中微量的 DNA 检测成为可能,极少量的癌基因改变也可以通过 PCR 技术水平扩增而被灵敏的纳米探针检测到,具有敏感、可靠、可重复性以及费用低等优势。研究结果显示胰腺癌患者血浆 *K-ras* 基因突变的阳性率为 35.3%,表明纳米捕获探针体系能有效检测到胰腺癌患者血浆中极少量的 DNA 突变情况,通过分析胰腺癌 *K-ras* 突变与各个临床病理指标的相关性结果显示 *K-ras* 突变组患者淋巴结转移率为 61.1%,明显高于未突变组的 18.2% ($P < 0.05$),*K-ras* 突变组患者神经受侵率为 72.2%,明显高于未突变组的 30.3% ($P < 0.05$),这充分说明血浆中出现 *K-ras* 突变是一个影响胰腺癌病程与侵袭能力的因素,其有望成为一个可靠判断胰腺癌根治术后复发转移、预后的指标。

本研究血浆 *K-ras* 基因突变组 1 年无瘤生存率为 41.3%,野生组为 66.3%,差异有统计学意义,提示胰腺癌 *K-ras* 基因突变者根治术后易早期复发或转移,与临床病理指标结合分析其原因可能是 *K-ras*

基因突变导致胰腺癌更有侵袭力,尤其与淋巴道、神经侵犯转移相关。而血浆 *K-ras* 基因突变组 2 年总生存率为 11.7%,野生组为 26.4%,差异有统计学意义,亦充分说明血浆 *K-ras* 基因突变可能是胰腺癌患者术后中远期预后不良的一个重要分子生物学指标,结合上腹部 CT 等临床指标可以指导临床医生对患者的预后、病情进程作出更加准确的判断,从而实施个体化治疗。

总之,采用纳米捕获探针体系能可靠、痕量检测胰腺癌患者血浆 *K-ras* 基因突变,结果表明其在胰腺癌淋巴道转移中起重要作用,并影响胰腺癌根治术后无瘤生存期、总生存期。因此,血浆 *K-ras* 基因可能成为预测胰腺癌根治术后复发和预后判断的一个重要指标。不过本研究的样本数较少且随访时间偏短,故上述结果有待更大样本的研究来验证。

参考文献:

- [1] Singh N, Gupta S, Pandey RM, et al. High levels of cell-free circulating nucleic acids in pancreatic cancer are associated with vascular encasement, metastasis and poor survival[J]. *Cancer Invest*, 2015, 33(3): 78-85.
- [2] Zhengwei S, Fei C, Xiaoguang W, et al. The Relevance of SLC29A1 gene single nucleotide polymorphism with resistance of gemcitabine chemotherapy and prognosis in advanced pancreatic cancer [J]. *Journal of Chinese Oncology*, 2016, 22(3): 209-213. [宋政伟, 陈飞, 王晓光, 等. SLC29A1 基因 C177G 单核苷酸多态性与晚期胰腺癌吉西他滨化疗耐药及预后相关性的研究[J]. *肿瘤学杂志*, 2016, 22(3): 209-213.]
- [3] Shin SH, Kim SC, Hong SM, et al. Genetic alterations of *K-ras*, *p53*, *c-erbB-2*, and *DPC4* in pancreatic ductal adenocarcinoma and their correlation with patient survival[J]. *Pancreas*, 2013, 42(2): 216-222.
- [4] Buscail L, Bournet B, Dufresne M, et al. Advance in the biology of pancreatic of cancer[J]. *Bull Cancer*, 2015, 102(6 Suppl 1): S53-S61.
- [5] Krishnan S, Rana V, Janjan NA, et al. Prognostic factors in patients with unresectable locally advanced pancreatic adenocarcinoma treated with chemoradiation [J]. *Cancer*, 2006, 107(11): 2589-2596.
- [6] Delpe Y, Hanoun N, Lulka H, et al. Genetic and epigenetic alterations in pancreatic carcinogenesis [J]. *Curr Genomics*, 2011, 12(1): 15-24.
- [7] Wang XG, Ni QF, Chen F, et al. The study of the relationship between clinical stage, or prognostic and kirsten rat sarcoma viral oncogene mutations of patients with pancreatic cancer detected by a nano probe [J]. *Chinese Journal of Experimental Surgery*, 2017, 34(3): 375-377. [王晓光, 倪全法, 陈飞, 等. 纳米探针检测鼠类肉瘤病毒癌基因突变与胰腺癌分期及预后的研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 2017, 34(3): 375-377.]
- [8] Chen H, Tu H, Meng ZQ, et al. *K-ras* mutational status predicts poor prognosis in unresectable pancreatic cancer [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2010, 36(7): 657-662.