

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.01158

胰腺癌组织中 BRAF 基因和 KRAS 基因突变分析

Analysis of BRAF and KRAS gene mutations in human pancreatic carcinomas

程张军^{1,2}, 石欣², 杨平华¹, 沈锋^{1*}

1. 第二军医大学东方肝胆外科医院肝外四科, 上海 200438

2. 东南大学附属中大医院普通外科, 南京 210009

[摘要] **目的** 探讨人胰腺癌组织中 BRAF 和 KRAS 基因突变情况及两者的关系。**方法** 对 36 例胰腺癌组织及癌旁胰腺组织中 BRAF 基因 15 号外显子及 KRAS 基因 12 号密码子进行测序。**结果** 36 例胰腺癌组织中, 25 例出现 KRAS 基因 12 号密码子突变(69.4%, 25/36), 3 例出现 BRAF 基因 V600E 突变(8.3%, 3/36), 且均同时存在 KRAS 突变; 11 例 KRAS 野生型胰腺癌组织中未发现 BRAF 突变; 癌旁胰腺组织中均未检出突变。**结论** 胰腺癌组织中 BRAF 基因突变可能并非主要突变, 且常与 KRAS 基因突变同时存在。

[关键词] 胰腺肿瘤; BRAF; KRAS; 基因突变

[中图分类号] R 735.9

[文献标志码] B

[文章编号] 0258-879X(2011)10-1158-03

RAS-RAF-MEK-ERK-MAPK 信号通路被认为与肿瘤的发生、发展密切相关, 其主要成员 KRAS 和 BRAF 的突变性激活可导致细胞的异常增殖和向恶性表型转化^[1]。近年来, 研究发现, 除 KRAS 突变外, 在多种肿瘤组织中还存在不同比例的 BRAF 突变, 且与 KRAS 突变具有相互排斥的性质, 提示两者对与细胞生长有关的胞间信号转导系统的激活可能相互独立, BRAF 蛋白可能独立于 RAS 蛋白而发挥作用^[2-5]。但 BRAF 突变和 KRAS 突变的确切关系及其在肿瘤发生发展中的作用尚存争议^[6-7], 在胰腺癌中更是缺乏深入研究。因此, 本研究通过检测胰腺癌组织中 KRAS 和 BRAF 基因的突变情况, 初步探讨两者的关系, 为后续研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 标本来源及患者资料 与患者签署知情同意后, 收集东南大学附属中大医院及第二军医大学长海医院普通外科 2004 年 6 月至 2010 年 6 月因胰腺癌手术切除标本 36 例(中大医院 20 例, 长海医院 16 例), 对应癌旁胰腺组织取自距肿瘤边缘 2 cm 以上, 所有肿瘤标本均经病理检查证实为胰腺癌。其中, 男性 21 例, 女性 15 例, 年龄 45~75 岁, 平均(62.2±7.7)岁。肿瘤分期参照国际抗癌协会(UICC)的 TNM 分期标准^[8]。患者具体资料见表 1。手术切除后立即切取标本, 快速液氮冷冻, -80℃保存。

1.2 DNA 提取 组织样本清洗后剪碎, 裂解, 进行酚-氯仿抽提 DNA。取 1 μl 样本 DNA 行 1% 琼脂糖凝胶电泳对其样本进行质量检查以及浓度估计, 然后根据估计的浓度将样本稀释到工作浓度 5~10 ng/μl。对于没有明显 DNA 条带的样本则不稀释。

1.3 PCR 扩增 引物用在线 Primer3 软件设计。针对 KRAS 基因第 2 外显子上第 12 号密码子及 BRAF 基因第 15 外显子分别设计 2 对引物。KRAS 上游: 5'-AAA GGT ACT GGT GGA GTA TTT GAT AGT G-3', 下游: 5'-TCA TGA AAA TGG TCA GAG AAA CCT-3'; BRAF 上游: 5'-ACT GAA TAT AAA CTT GTG GTA GTT GGA CCT-3', 下游: 5'-TCA AAG AAT GGT CCT GGA CC-3'。PCR 总反应体系 20 μl, 内含 1× HotStarTaq Buffer、2.0 mmol/L Mg²⁺、0.2 mmol/L dNTP、0.2 μmol/L 引物、1 U HotStarTaq 酶(Qiagen 公司, 德国)和 1 μl 模板 DNA。KRAS 扩增条件: 第 1 步, 95℃ 15 min; 第 2 步, 94℃ 15 s, 62℃ 40 s, 72℃ 1 min, 11 个循环; 第 3 步, 94℃ 15 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 24 个循环; 第 4 步, 72℃ 2 min。BRAF 扩增条件: 第 1 步, 95℃ 10 min; 第 2 步, 94℃ 45 s, 58℃ 30 s, 72℃ 1 min, 30 个循环; 第 3 步, 72℃ 7 min。产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.4 PCR 产物纯化 取 8 μl PCR 产物, 加入 1 U 虾碱酶 SAP 和 6 U 外切酶 Exo I (Promega 公司, 美国), 37℃ 水浴 60 min, 然后 70℃ 水浴 10 min。

1.5 测序分析 按 BigDye3.1 试剂盒(美国 ABI 公司)说明书进行操作。取纯化的 PCR 产物 2 μl, 加入 BigDye3.1 混合液 2 μl 和 0.4 μmol/L 测序引物 2 μl (KRAS: 5'-AAA GGT ACT GGT GGA GTA TTT GAT AGT G-3'; BRAF: 5'-ACT GAA TAT AAA CTT GTG GTA GTT GGA CCT-3')。反应条件: 首先, 96℃ 1 min; 然后, 96℃ 10 s, 50℃ 5 s, 28 个循环; 最后, 60℃ 4 min。测序产物上 ABI3130XL 测序仪(美国 ABI 公司), 测序文件用 Polyphred 软件分析并结合人工校对记录后整理出结果。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 11.5 统计学软件进行数据处

[收稿日期] 2011-04-18

[接受日期] 2011-09-22

[基金项目] 国家自然科学基金(30700801, 30500491)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30700801, 30500491)。

[作者简介] 程张军, 博士生, 主治医师。E-mail: chengzhangjun2003@hotmail.com

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-81875242, E-mail: shenfengdfgd@yahoo.com.cn

理, 组间比较采用 χ^2 检验, KRAS 突变与临床病理特征的关系采用 Spearman 秩和检验, 检验水准 (α) 为 0.05。

表 1 36 例胰腺癌患者临床资料及基因突变情况

序号	性别	年龄 (岁)	组织学类型	肿瘤直径 d/cm	分期	突变类型	
						KRAS	BRAF
1	女	56	导管腺癌	4.0	IV	-	-
2	女	52	导管腺癌	4.1	IV	-	-
3	男	56	导管腺癌	3.5	II	-	-
4	男	74	导管腺癌	2.2	III	-	-
5	女	62	导管腺癌	2.5	II	-	-
6	男	73	腺鳞癌	3.7	III	-	-
7	男	45	导管腺癌	3.5	III	-	-
8	男	52	导管腺癌	5.0	III	-	-
9	男	51	导管内乳头状腺癌	4.5	I	-	-
10	男	63	导管腺癌	4.2	III	-	-
11	男	62	导管腺癌	3.0	II	-	-
12	女	64	导管腺癌	5.0	III	G5570C	-
13	女	61	导管腺癌	5.5	III	G5570C	-
14	男	70	导管腺癌	6.5	III	G5570C	T1799A
15	女	67	导管腺癌	4.8	III	G5570C	-
16	男	75	导管腺癌	3.3	III	G5570C	-
17	男	58	导管腺癌	3.5	II	G5570C	-
18	男	57	导管腺癌	2.5	I	G5570C	-
19	男	69	导管腺癌	3.5	III	G5570C	-
20	女	68	导管腺癌	3.8	III	G5571A	-
21	女	66	导管腺癌	4.0	IV	G5571A	-
22	男	59	导管腺癌	3.8	IV	G5571A	-
23	女	48	导管腺癌	4.1	III	G5571A	-
24	女	69	导管腺癌	4.5	III	G5571A	-
25	女	67	内分泌癌	6.5	IV	G5571A	T1799A
26	男	68	导管腺癌	3.0	IV	G5571A	-
27	男	57	导管腺癌	2.0	II	G5571A	-
28	男	62	导管腺癌	2.8	I	G5571A	-
29	女	51	导管腺癌	4.3	III	G5571A	-
30	女	72	导管腺癌	3.0	III	G5571A	-
31	男	70	导管腺癌	3.3	II	G5571A	T1799A
32	女	60	导管腺癌	4.0	III	G5571A	-
33	男	63	导管腺癌	3.4	IV	G5571A	-
34	男	71	导管腺癌	5.1	III	G5571A	-
35	男	58	导管腺癌	3.7	III	G5571A	-
36	女	62	导管腺癌	3.2	II	G5571A	-

2 结果

2.1 胰腺癌组织中 KRAS 和 BRAF 基因突变情况 胰腺癌组织中 KRAS 基因第 2 外显子上的 12 号密码子突变频率较高, 约为 69.4% (25/36, 图 1), 而在癌旁胰腺组织未检出突变。在 11 例无 KRAS 突变的胰腺癌组织中未发现 BRAF 突变。在 25 例含 KRAS 基因 12 号密码子突变的胰腺癌组织中, 3 例含 BRAF 突变 (图 2), 突变频率约为 8.3% (3/36), 而在癌旁胰腺组织中均未检出 BRAF 突变。所有患者突变类型见表 1。

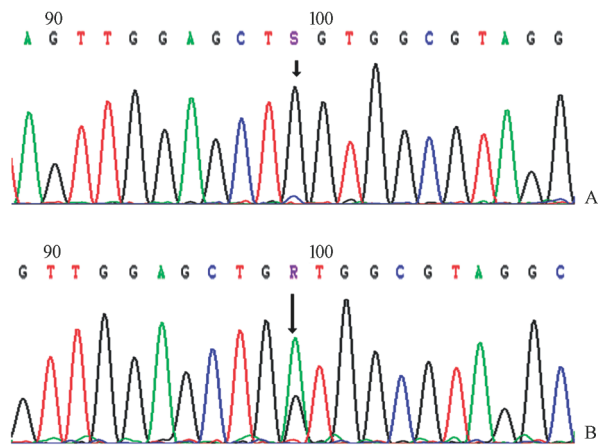


图 1 胰腺癌组织中 KRAS 基因 12 号密码子突变情况 A: 第 5570 位核苷酸 G 突变为 C (箭头); B: 第 5571 位核苷酸 G 突变为 A (箭头)

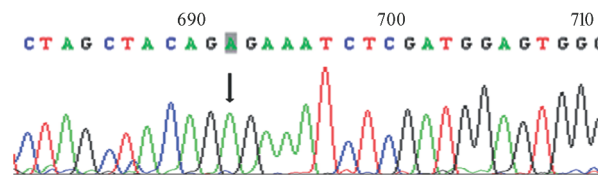


图 2 胰腺癌组织中 BRAF 基因 15 号外显子突变情况 第 1799 位核苷酸 T 突变为 A (箭头)

2.2 KRAS 和 BRAF 基因突变与临床病理特征的关系 根据 TNM 分期系统, 本组患者中 KRAS 基因突变情况为 I 期 2/3、II 期 4/7、III 期 14/19、IV 期 5/7, KRAS 突变与患者性别、年龄、肿瘤大小等相关性不大。3 例 BRAF 突变分别发生于 II、III、IV 期患者 (表 1)。

3 讨论

BRAF 基因是 RAF 家族的成员之一, 位于 7q34, 长约 190 kb, 转录 mRNA 长约 2.5 kb, 编码 783 个氨基酸的蛋白, 相对分子质量为 94 000~95 000^[9]。在绝大多数组织和细胞类型中, BRAF 仍是 MEK/ERK 最为关键的激活因子^[10-11]。研究表明, 在多种人类恶性肿瘤中, 如恶性黑素瘤、结肠癌、肝癌、肺癌及甲状腺癌等均存在不同比例的 BRAF 突变。约 89% 的突变发生在 exon15 上的激活区, 其中 92% 位于第 1799 位核苷酸上, T 突变为 A (T1799A), 导致其编码的谷氨酸由缬氨酸取代 (V600E)^[12]。BRAF V600E 突变能模拟 T598 和 S601 两个位点的磷酸化作用, 使 BRAF 蛋白激活。BRAF 蛋白突变性激活后导致 MEK/ERK 激活, 通过转录物或非转录物的方式影响肿瘤进展, 包括促进细胞增殖和侵袭、改变整合素的表达、降低 E-钙黏素表达及增加基质金属蛋白酶 (MMP) 分泌等^[13]。

胰腺癌中, KRAS 基因的 12 号密码子存在高频突变^[14], 突变的 RAS 基因能转化 NIH3T3 细胞株并能通过持续激活 RAF-MEK-ERK-MAPK 生长信号转导系统。因此, KRAS 及其下游的 RAF-MEK-ERK-MAPK 信号通路被认为与胰腺癌的发生显著相关。然而, 仍有 10%~30% 的胰腺癌中并

未发现 KRAS 激活性突变,既然 RAS-RAF-MEK-ERK-MAPK 信号通路的激活对胰腺癌的发生至关重要,那么,在无 KRAS 突变的胰腺癌中,则可能存在 BRAF 或该通路中其他组分的激活性突变。研究表明,结直肠癌(CRC) BRAF 突变率约 15%,且 90%以上为 V600E 突变,并与 KRAS 突变负相关;且同一肿瘤组织中,V600E 突变独立于 KRAS 突变。他们还发现与 KRAS 突变不同,BRAF 突变与结直肠癌分期显著相关(Dukes A、B 期>C、D 期),但与性别、年龄、肿瘤分化状态、部位无关^[15-17]。在肺癌^[18]、前列腺癌^[2]、卵巢浆液性癌^[3]中,人们也发现相似的结果。因此,他们认为在 BRAF 和 KRAS 突变具有互相排斥的性质,可能是相互独立的遗传事件,分别影响肿瘤的进程。

胰腺癌中 BRAF 基因突变情况的研究较少。Ishimura 等^[7]通过检测 28 例包括导管腺癌、黏液性癌和乳头状癌在内的胰腺癌标本 BRAF 基因的突变情况,发现 19 例存在 KRAS 12 号密码子突变,其中 2 例同时含有 BRAF V600E 突变,在 KRAS 野生型的胰腺癌组织中,并未检测出 BRAF 基因突变,与本研究结果相似。Schonleben 等^[19-20]在胰腺导管内乳头状瘤、壶腹部肿瘤中同样也发现 BRAF V600E 突变并未独立于 KRAS 突变而存在,而且突变频率较低。

本研究中,通过检测突变频率最高、最为重要的 KRAS 12 号密码子和 BRAF 15 号外显子中可能存在的突变,我们发现,KRAS 12 号密码子的突变频率和突变类型与文献报道相近。与其他报道^[2-3, 15-18]不同的是,在 3 例含 BRAF V600E 突变的胰腺癌组织中,均同时存在 KRAS 突变,而 11 例 KRAS 为野生型的胰腺癌组织中未发现 BRAF 突变。这提示在胰腺癌中,BRAF 突变属低频事件,且和 KRAS 突变同时存在,可能在胰腺癌的发生、发展中共同发挥某种作用。

总之,本研究表明,胰腺癌中 BRAF 突变并非主要突变,且与 KRAS 突变有关。BRAF 突变与 KRAS 突变的确切关系及其与 RAF 家族其他成员在胰腺癌的发生、发展中的作用仍有待进一步研究。

(志谢 本研究得到第二军医大学长海医院普外三科周颖琦教授和邵成浩副教授的大力支持和帮助,在此表示衷心感谢!)

[参考文献]

[1] Bonni A, Brunet A, West A E, Datta S R, Takasu M A, Greenberg M E. Cell survival promoted by the Ras-MAPK signaling pathway by transcription-dependent and -independent mechanisms[J]. Science, 1999, 286: 1358-1362.

[2] Cho N Y, Choi M, Kim B H, Cho Y M, Moon K C, Kang G H. BRAF and KRAS mutations in prostatic adenocarcinoma[J]. Int J Cancer, 2006, 119: 1858-1862.

[3] Cho Y H, Kim D Y, Kim J H, Kim Y M, Kim K R, Nam J H, et al. Mutational analysis of KRAS, BRAF, and TP53 genes of ovarian serous carcinomas in Korean women[J]. Yonsei Med J, 2009, 50: 266-272.

[4] Farina-Sarasqueta A, van Lijnschoten G, Moerland E, Creemers G J, Lemmens V E, Rutten H J, et al. The BRAF V600E mutation is an independent prognostic factor for survival in stage II and stage III colon cancer patients[J]. Ann Oncol, 2010, 21:

2396-2402.

[5] Yokota T, Ura T, Shibata N, Takahari D, Shitara K, Nomura M, et al. BRAF mutation is a powerful prognostic factor in advanced and recurrent colorectal cancer[J]. Br J Cancer, 2011, 104: 856-862.

[6] Oliveira C, Velho S, Moutinho C, Ferreira A, Preto A, Domingo E, et al. KRAS and BRAF oncogenic mutations in MSS colorectal carcinoma progression[J]. Oncogene, 2007, 26: 158-163.

[7] Ishimura N, Yamasawa K, Karim Rumi M A, Kadowaki Y, Ishihara S, Amano Y, et al. BRAF and K-ras gene mutations in human pancreatic cancers[J]. Cancer Letters, 2003, 199: 169-173.

[8] Sobin L H, Wittekind C. TNM classification of malignant tumors [M]. 6th ed. New York: UICC, Wiley-Liss, 2002: 81-83.

[9] Meyer P, Sergi C, Garbe C. Polymorphisms of the BRAF gene predisposes males to malignant melanoma[J]. J Carcinog, 2003, 2: 7-11.

[10] Huser M, Luckett J, Chiloeches A, Mercer K, Iwobi M, Giblett S, et al. MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function [J]. EMBO J, 2001, 20: 1940-1951.

[11] Mikula M, Schreiber M, Husak Z, Kucerova L, Růth J, Wieser R, et al. Embryonic lethality and fetal liver apoptosis in mice lacking the c-raf-1 gene[J]. EMBO J, 2001, 20: 1952-1962.

[12] Davies H, Bignell G R, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer[J]. Nature, 2002, 417: 949-954.

[13] Smalley K S. A pivotal role for ERK in malignant melanoma [J]. Int J Cancer, 2003, 104: 527-532.

[14] Song M M, Nio Y, Dong M, Tamura K, Furuse K, Tian Y L, et al. Comparison of K-ras point mutations at codon 12 and p21 expression in pancreatic cancer between Japanese and Chinese patients[J]. J Surg Oncol, 2000, 75: 176-185.

[15] Wang L, Cunningham J M, Winters J L, French A J, Boardman L A, et al. BRAF mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair[J]. Cancer Res, 2003, 63: 5209-5212.

[16] Fransen K, Klintenas M, Osterstrom A, Dimberg J, Monstein H J, Söderkvist P, et al. Mutation analysis of the BRAF, ARAF and RAF-1 genes in human colorectal adenocarcinomas [J]. Carcinogenesis, 2004, 25: 527-533.

[17] Yuen S T, Davies H, Chan T L, Ho J W, Bignell G R, Cox C, et al. Similarity of the phenotypic patterns associated with BRAF and KRAS mutations in colorectal neoplasia [J]. Cancer Res, 2002, 62: 6451-6455.

[18] Naoki K, Chen T H, Richards W G, Sugarbaker D J, Meyerson M. Missense mutations of the BRAF gene in human lung adenocarcinoma [J]. Cancer Res, 2002, 62: 7001-7003.

[19] Schonleben F, Qiu W, Allendorf J D, Chabot J A, Remotti H E, Su G H. Molecular analysis of PIK3CA, BRAF, and RAS oncogenes in periampullary and ampullary adenomas and carcinomas [J]. J Gastrointest Surg, 2009, 13: 1510-1516.

[20] Schonleben F, Allendorf J D, Qiu W, Li X, Ho D J, Ciaun N T, et al. Mutational analyses of multiple oncogenic pathways in intra-ductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas [J]. Pancreas, 2008, 36: 168-172.

[本文编辑] 周燕娟, 贾泽军