

非小细胞肺癌患者 KRAS 基因突变 与临床病理特征分析

赵守香 郭琴 李颖 王涛 田胜南 蔡晓珊

作者单位: 261041 山东潍坊, 潍坊市第二人民医院病理科

通信作者: 蔡晓珊, Email: caixiaoshan9025@126.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2021.04.008

【摘要】 目的 检测非小细胞肺癌(NSCLC)患者的 KRAS 基因突变,并分析不同突变状态 NSCLC 患者的临床病理特征。方法 选择 2018 年 9 月—2020 年 9 月就诊于潍坊市第二人民医院且临床资料完整的 453 例经病理组织学确诊的原发性 NSCLC 患者作为研究对象。采用环形引物双扩增技术检测所有患者组织标本中 KRAS 基因的突变状态,分析不同基因突变患者的临床病理特征。结果 453 例 NSCLC 患者中有 50 例存在 KRAS 突变,突变率为 11.04%。其中 KRAS 基因突变率男性患者高于女性[8.61% (39/453) 比 2.43% (11/453)],有吸烟史患者高于无吸烟史患者[7.28% (33/453) 比 3.76% (17/453)],腺癌患者高于其他类型癌症患者[10.15% (46/453) 比 0.89% (3/453)],差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。KRAS 基因的 2 种突变类型(G12A/V/R/C、G13C 型和 G12D/S 型)例数在不同性别、病理类型、吸烟史、年龄、临床分期及淋巴结转移方面比较差异均无统计学意义。结论 NSCLC 患者中 KRAS 基因存在较高的突变率,了解该基因的突变情况有助于提高临床工作者对包含 KRAS 基因突变 NSCLC 的认识,有利于指导对患者的个体化治疗。

【关键词】 非小细胞肺癌; KRAS 基因; 临床病理特征

基金项目: 山东省潍坊市卫生健康委科研项目(WFWSJK-2020-049, WFWSJK-2020-078)

Analysis of KRAS gene mutation and clinicopathological characteristics in patients with non-small cell lung cancer

Zhao Shouxiang, Guo Qin, Li Ying, Wang Tao, Tian Shengnan, Cai Xiaoshan. Department of Pathology, Weifang No. 2 People's Hospital, Weifang 261041, Shandong, China

Corresponding author: Cai Xiaoshan, Email: caixiaoshan9025@126.com

【Abstract】 Objective To detect the KRAS gene mutation in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC) and analyze the clinicopathological characteristics of NSCLC patients with different mutation states. **Methods** A total of 453 patients with primary NSCLC diagnosed by histopathology who were treated in Weifang No. 2 People's Hospital from September 2018 to September 2020 with complete clinical data were selected as the research objects. ADx-amplification refractory mutation system was used to detect the mutation status of KRAS gene in tissue samples, and the clinicopathological features of patients with different gene mutations were analyzed. **Results** There were 50 cases with KRAS gene mutation in 453 patients with NSCLC, and the mutation rate was 11.04%. Among NSCLC patients, the mutation rate of KRAS gene in male was higher than that in female [8.61% (39/453) vs. 2.43% (11/453)], the mutation rate in patients with smoking history was higher than that in patients without smoking history [7.28% (33/453) vs. 3.76% (17/453)], and the mutation rate in patients with adenocarcinoma was higher than that in other types of cancer [10.15% (46/453) vs. 0.89% (3/453)]. There was no significant difference in the number of cases with two mutation types of KRAS (G12A/V/R/C, G13C type and G12D/S type) in different genders, pathological types, smoking history, ages, clinical stages and lymph node metastasis. **Conclusions** There is a high mutation rate of KRAS gene in NSCLC patients. Understanding the mutation of KRAS gene will help to improve the clinical workers' understanding of NSCLC containing KRAS mutation and guide the individualized treatment of patients.

【Key words】 Non-small cell lung cancer; KRAS gene; Clinicopathological characteristic

Fund Program: Scientific Research Project of Health Commission of Weifang City, Shandong Province (WFWSJK-2020-049, WFWSJK-2020-078)

目前肺癌在全球癌症发病率中位居第一,世界卫生组织(World Health Organization, WHO)国际癌症研究署发布的癌症报告显示,2018 年全球肺癌新

发病例约有 209 万例,死亡患者约 176 万例,分别占恶性肿瘤新发病例及死亡病例的 11.6% 和 18.4%,居恶性肿瘤第 1 位,其中非小细胞肺癌(non-small

cell lung cancer, NSCLC) 在肺癌中占 80%~85%^[1]。当前治疗肺癌的主要措施除了手术、放疗、化疗,还有靶向治疗和免疫治疗。随着酪氨酸激酶抑制剂 (tyrosine kinase inhibitor, TKI) 靶向药物治疗在 NSCLC 患者中广泛应用,其无进展生存期 (progression-free survival, PFS) 较单纯化疗明显延长,但到目前为止,尚无针对 KRAS 基因突变靶点的有效药物广泛应用于国内临床,所以对 KRAS 基因突变的 NSCLC 患者的治疗方案仍是一个悬而未解的问题^[2]。本研究收集 2018 年 9 月—2020 年 9 月 453 例 NSCLC 患者的临床资料,总结并分析是否存在 KRAS 基因突变患者的临床病理特征,旨在深入了解 KRAS 基因突变,从而指导临床进行个体化治疗,现报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选择潍坊市第二人民医院 2018 年 9 月—2020 年 9 月进行手术切除、纤维支气管镜和穿刺活检经病理确诊且资料完整的 453 例原发性 NSCLC 患者作为研究对象。标本经 10% 中性福尔马林溶液固定、石蜡包埋、切片以及苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色,并确定肿瘤细胞数量足够,再进行后续试验。分类整理所有患者的临床资料,包括一般情况 (性别、年龄、吸烟史) 和临床病理资料 (包括病理组织学类型、临床分期、淋巴结转移情况)。

1.2 试剂与仪器 石蜡切片组织基因组 DNA 提取试剂盒、5 种突变基因检测试剂盒均购自厦门艾德生物医药科技有限公司; SLAN-96S 实时荧光定量聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪 (购自上海宏石医疗科技有限公司), Eppendorf 微量紫外分光光度计。

1.3 检测方法

1.3.1 石蜡切片标本组织的基因组 DNA 提取 评估肿瘤细胞含量后,使用一次性切片刀切取 4~12 片组织切片,置于洁净的 1.5 mL 离心管中,按照 DNA 提取试剂盒说明书示范操作进行 DNA 抽提。使用 Eppendorf SMA4000 微量紫外分光光度计测定 DNA 的纯度及含量。

1.3.2 KRAS 基因突变检测 采用突变扩增阻滞系统 (amplification refractory mutation system, ARMS) 扩增 KRAS 基因的 12 和 13 密码子。操作方法依据试剂盒说明书,反应循环参数为: 42 °C 5 min; 95 °C 5 min, 1 个循环; 95 °C 25 s, 64 °C 20 s, 72 °C 20 s, 10 个循环; 93 °C 25 s, 60 °C 35 s, 72 °C 20 s, 36 个

循环。反应结束后,由荧光定量 PCR 仪输出扩增曲线,根据试剂盒说明书中的判读原则来确定突变。每次 ARMS 分析实验均设置阳性及阴性对照,以保证结果的准确性。

1.4 伦理学 本研究符合医学伦理学标准,并经本院伦理审批 (审批号: 20201225), 所有检测均获得过患者或家属的知情同意。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 22.0 软件对数据进行分析和处理,计数资料以例 (%) 表示,采用 χ^2 检验比较 KRAS 基因突变及其各突变类型 NSCLC 患者的临床病理特征。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCLC 患者肿瘤组织 KRAS 基因突变情况 在 453 例接受 5 种基因突变检测的 NSCLC 患者中,检出 KRAS 基因突变 50 例,总突变率为 11.04%。该试剂盒检测出两种突变类型,分别为 G12D/S 型突变 6 例,突变率为 1.32%,以及 G12A/V/R/C、G13C 型突变 44 例,突变率为 9.71%。见表 1。

表 1 453 例 NSCLC 患者肿瘤组织 KRAS 基因突变情况

突变类型	例数 (例)	突变率 (%)
G12D/S 型	6	1.32
G12A/V/R/C、G13C 型	44	9.71
合计	50	11.04

注: NSCLC 为非小细胞肺癌

2.2 不同临床病理特征 NSCLC 患者的 KRAS 基因突变情况比较 男性、腺癌、有吸烟史的 NSCLC 患者更易发生 KRAS 基因突变,其突变率明显高于女性、其他类型癌症以及无吸烟史的 NSCLC 患者 (均 $P < 0.05$)。虽然 KRAS 基因突变率在不同年龄、临床分期以及有无淋巴结转移的 NSCLC 患者中不同,但差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。见表 2。

2.3 不同临床病理特征 NSCLC 患者 KRAS 基因的突变类型分布 试剂盒检测出的 KRAS 基因两种突变类型在不同性别、年龄、病理类型、临床分期、有无吸烟史以及有无淋巴结转移的 NSCLC 患者中比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。见表 3。

3 讨论

KRAS 是 NSCLC 患者中常见的突变癌基因之一,已知参与肺癌发生以及肿瘤生长、转移和扩散等多个过程^[3]。NSCLC 患者中约有 20%~30% 存在 KRAS 基因突变,在大多数情况下, KRAS 基因突变是由于外显子 2、密码子 12 和 13 的错义突变,但也存在更罕见的等位基因突变^[4]。KRAS 基因

表 2 不同临床病理特征 453 例 NSCLC 患者的 KRAS 基因突变情况

临床资料	例数(例)	KRAS 基因			χ^2 值	P 值
		野生型(例)	突变型(例)	突变率(%)		
性别					10.559	0.001
男性	256	217	39	8.61		
女性	197	186	11	2.43		
病理类型					8.280	0.016
腺癌	385	339	46	10.15		
鳞癌	57	56	1	0.22		
其他	11	8	3	0.67		
吸烟史					8.923	0.003
有	209	176	33	7.28		
无	244	227	17	3.76		
临床分期					0.956	0.328
I+II 期	136	118	18	3.97		
III+IV 期	317	285	32	7.07		
淋巴结转移					0.000	0.984
有	244	217	27	5.96		
无	209	186	23	5.08		
年龄					0.020	0.887
<60 岁	149	133	16	3.53		
≥60 岁	304	270	34	7.50		

注: NSCLC 为非小细胞肺癌

与大鼠 V-Ha-Ras Harvey 肉瘤病毒癌基因和神经母细胞瘤 RAS 病毒癌基因一起编码一个膜结合的相对分子质量为 21 000 的鸟苷三磷酸(guanosine triphosphate, GTP)结合蛋白家族,该家族通过与多种效应物的相互作用来调节细胞生长、分化和凋亡,这些效应物包括丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、信号转导和转录激活子(signal transducer and activator of transcription, STAT)以及磷酸肌醇-3 激酶(phosphatidylinositol-3 kinase, PI3K)信号通路^[5]。

KRAS 基因在欧美国家 NSCLC 患者中的突变频率较高,在肺腺癌患者中突变率可达到 30%~50%,但亚洲地区的 KRAS 基因突变率低于欧美地区,约为 10%^[6-7]。KRAS 基因突变与患者的临床病理特征、肿瘤组织学、种族差异以及有无吸烟史有一定相关性^[8]。KRAS 基因突变常发生在肺腺癌患者中(突变率约为 30%),而在鳞状细胞癌患者中较少见(突变率约为 5%)^[9];且该突变与吸烟习惯存在明显相关性^[5]。本研究中 NSCLC 患者的 KRAS 基因突变率为 11.04%,且该突变较易发生于有吸烟史的男性患者中,这与文献报道一致^[10]。本研究结果还显示, KRAS 基因中 G12D/S 型和 G12A/V/R/C、G13C 型这两种突变类型在不同性别、年龄、临床分

表 3 不同临床病理特征 50 例 NSCLC 患者的 KRAS 基因突变分型分布

临床资料	例数(例)	KRAS 突变分型(例)			χ^2 值	P 值
		G12A/V/R/C、G13C 型	G12D/S 型			
性别					0.113	0.737
男性	39	34	5			
女性	11	10	1			
病理类型					0.593	0.441
腺癌	46	40	6			
鳞癌	1	1	0			
其他	3	3	0			
吸烟史					0.246	0.620
有	33	28	5			
无	17	16	1			
临床分期					0.063	0.802
I+II 期	19	17	2			
III+IV 期	31	27	4			
淋巴结转移					0.044	0.834
有	23	20	3			
无	27	24	3			
年龄					0.006	0.941
<60 岁	16	14	2			
≥60 岁	34	30	4			

注: NSCLC 为非小细胞肺癌

期、病理类型、有无吸烟史以及有无淋巴结转移的 NSCLC 患者中存在差异,但无统计学意义。由于本研究中 KRAS 基因突变病例数较少,它们之间是否具有相关性还需进一步的研究。

据文献报道, KRAS 基因不同突变亚型的生物学功能不同,可能与鸟苷三磷酸酶(GTPase)活性存在差异有关^[11],这就为探讨 KRAS 基因不同突变亚型与预后之间的关系提出了必要性,但关于这方面的研究结果在既往文献报道中并不一致。Cai 等^[12]研究表明,存在 KRAS 基因 G12D 型突变的患者 PFS 和总生存期(overall survival, OS)均比 KRAS 基因 G12C 型突变和 G12V 型突变的患者短。随着对 KRAS 突变型 NSCLC 的研究,越来越多的文献表明, KRAS 基因突变型 NSCLC 实际上是一种异质性疾病,可能由共同发生改变的染色体定义的分子亚群导致。在某些情况下同时发生的基因突变似乎在某种程度上调控了细胞内的生理过程,并影响肿瘤在其微环境中的行为^[13-15]。因此,在一项回顾性分析中,研究者分析了 NSCLC 患者中常见的 KRAS 基因突变亚型和同时并发其他致病性基因突变对患者 OS 的影响以及这些基因突变如何影响肿瘤 PD-L1 的表达,结果表明, KRAS 基因 G12D 和 STK11 共突变与患者预后不良有关^[16]。KRAS 基因 G12C 和

TP53 共突变与 PD-L1 阳性表达相关,预示着对此种突变型患者应用抗 PD-1/PD-L1 免疫治疗可能有效。

目前 KRAS 基因突变 NSCLC 患者的常用治疗方法仍为含铂双药化疗,患者的预后相对较差。汤伟忠等^[17]采用岩舒复方苦参注射液联合紫杉醇+顺铂化疗方案治疗 NSCLC 取得良好疗效。另一方面有研究表明,对 KRAS 基因突变的 NSCLC 患者应用吉非替尼靶向治疗,效果并不显著,且存在天然耐药趋势^[18]。该如何治疗此类患者的问题一直困扰着临床医生。近年来,一些针对 G12C 型突变抑制剂的研究逐渐成为靶向治疗 KRAS 基因突变 NSCLC 的主流方向。前期临床实验结果显示,AMG510 小分子抑制剂在 KRAS 基因 G12C 型突变的晚期肺癌患者中显示出有潜力的疗效以及可控的安全性^[19],期待后续的相关临床研究结果。另外,近年来免疫检查点抑制剂 (immune checkpoint inhibitors, ICIs) 作为一种挽救性治疗方法改善了 KRAS 基因突变的晚期 NSCLC 患者总生存期,这一结果表明 KRAS 基因突变状态可能是 ICIs 提高生存率的潜在生物标志物^[20]。这是否预示着 KRAS 基因突变肺癌患者能从单一的含铂双药化疗进入一个靶向治疗及免疫治疗的全新时代,有待进一步的研究。

综上所述,对 KRAS 基因突变 NSCLC 患者的准确临床管理对改善该类患者预后具有重要意义。关注此类患者的 KRAS 基因突变情况,并制定精准的个体化治疗方案,可以实现疗效的最大化,提高患者的生活质量。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- 尹春琼,王玉明.长链非编码 RNA 在非小细胞肺癌诊断及治疗中的研究进展[J].实用检验医师杂志,2020,12(2):123-126. DOI:10.3969/j.issn.1674-7151.2020.02.018.
- ETTINGER D S, WOOD D E, AISNER D L, et al. Non-small cell lung cancer, version 5. 2017, NCCN clinical practice guidelines in oncology [J]. J Natl Compr Canc Netw, 2017, 15 (4): 504-535. DOI: 10.6004/jncn.2017.0050.
- PYLAYEVA-GUPTA Y, GRABOCKA E, BAR-SAGI D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web [J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11 (11): 761-774. DOI: 10.1038/nrc3106.
- KARACHALIOU N, MAYO C, COSTA C, et al. KRAS mutations in lung cancer [J]. Clin Lung Cancer, 2013, 14 (3): 205-214. DOI: 10.1016/j.clcc.2012.09.007.
- RIELY G J, MARKS J, PAO W. KRAS mutations in non-small cell lung cancer [J]. Proc Am Thorac Soc, 2009, 6 (2): 201-205. DOI: 10.1513/pats.200809-107LC.
- LIU L P, LIU J L, SHAO D, et al. Comprehensive genomic profiling of lung cancer using a validated panel to explore therapeutic targets in

- East Asian patients [J]. Cancer Sci, 2017, 108 (12): 2487-2494. DOI: 10.1111/cas.13410.
- CHUN Y J, CHOI J W, HONG M H, et al. Molecular characterization of lung adenocarcinoma from Korean patients using next generation sequencing [J]. PLoS One, 2019, 14 (11): e0224379. DOI: 10.1371/journal.pone.0224379.
- OKUDELA K, WOO T, KITAMURA H. KRAS gene mutations in lung cancer: particulars established and issues unresolved [J]. Pathol Int, 2010, 60 (10): 651-660. DOI: 10.1111/j.1440-1827.2010.02580.x.
- ROBERTS P J, STINCHCOMBE T E, DER C J, et al. Personalized medicine in non-small-cell lung cancer: is KRAS a useful marker in selecting patients for epidermal growth factor receptor-targeted therapy? [J]. J Clin Oncol, 2010, 28 (31): 4769-4777. DOI: 10.1200/JCO.2009.27.4365.
- 陆玉霞,邓晓宇,伍铮,等.非小细胞肺癌驱动基因突变与临床病理特征的关系[J].临床与实验病理学杂志,2020,36(9):1023-1028. DOI:10.13315/j.cnki.cjcep.2020.09.004.
- HUNTER J C, MANANDHAR A, CARRASCO M A, et al. Biochemical and structural analysis of common cancer-associated KRAS mutations [J]. Mol Cancer Res, 2015, 13 (9): 1325-1335. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-15-0203.
- CAI D J, HU C P, LI L, et al. The prevalence and prognostic value of KRAS co-mutation subtypes in Chinese advanced non-small cell lung cancer patients [J]. Cancer Med, 2020, 9 (1): 84-93. DOI: 10.1002/cam4.2682.
- SKOULIDIS F, BYERS L A, DIAO L, et al. Co-occurring genomic alterations define major subsets of KRAS-mutant lung adenocarcinoma with distinct biology, immune profiles, and therapeutic vulnerabilities [J]. Cancer Discov, 2015, 5 (8): 860-877. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-14-1236.
- DONG Z Y, ZHONG W Z, ZHANG X C, et al. Potential predictive value of TP53 and KRAS mutation status for response to PD-1 blockade immunotherapy in lung adenocarcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2017, 23 (12): 3012-3024. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2554.
- KOYAMA S, AKBAY E A, LI YY, et al. STK11/LKB1 deficiency promotes neutrophil recruitment and proinflammatory cytokine production to suppress T-cell activity in the lung tumor microenvironment [J]. Cancer Res, 2016, 76 (5): 999-1008. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1439.
- AREDO J V, PADDA S K, KUNDER C A, et al. Impact of KRAS mutation subtype and concurrent pathogenic mutations on non-small cell lung cancer outcomes [J]. Lung Cancer, 2019, 133: 144-150. DOI: 10.1016/j.lungcan.2019.05.015.
- 汤伟忠,顾根网,王国方.岩舒复方苦参注射液联合 TP 方案治疗晚期非小细胞肺癌的疗效观察[J].中国中西医结合急救杂志,2019,25(2):227-229. DOI:10.3969/j.issn.1008-9691.2019.02.022.
- 刘芳,唐婷玉,杜坚宗,等.沙利度胺联合吉非替尼对晚期非小细胞肺癌患者生存质量及生存期的影响[J].中国生化药物杂志,2017,37(1):185-187. DOI:10.3969/j.issn.1005-1678.2017.01.054.
- 冯会博,张绪超. KRAS 突变型肺癌的分子通路特征与精准治疗进展[J].循证医学,2020,20(5):306-310. DOI:10.12019/j.issn.1671-5144.2020.05.011.
- KIM J H, KIM H S, KIM B J. Prognostic value of KRAS mutation in advanced non-small-cell lung cancer treated with immune checkpoint inhibitors: a meta-analysis and review [J]. Oncotarget, 2017, 8 (29): 48248-48252. DOI: 10.18632/oncotarget.17594.

(收稿日期:2021-09-03)

(本文编辑:郗文)