

血清 K-ras 基因突变检测联合 CA19-9 测定 在胰腺癌诊断中的应用

张 奕¹, 姬舒荣², 奉典旭³, 计 骏¹, 韩天权¹

Significance of Detection of K-ras Gene Mutations and CA19-9 in Serum for Diagnosis of Pancreatic Carcinoma

Zhang Yi¹, Ji Shu-Rong², Feng Dian-Xu³, Ji Jun¹, Han Tian-Quan¹

1. 上海第二医科大学附属瑞金医院消化外科研究所, 上海 200025;
2. 上海同济大学附属同济医院普外科, 上海 200065;
3. 上海市普陀区中心医院普外科, 上海 200065

1. Institute of Digestive Surgery,
Ruijin Hospital, Shanghai Second
Medical University, Shanghai,
200025, P. R. China;

2. Department of General Surgery,
Tongji Hospital of Tongji University,
Shanghai, 200065, P. R. China;

3. Department of General Surgery,
Central Hospital of Putuo District,
Shanghai, 200065, P. R. China

通讯作者 姬舒荣

Correspondence to: Ji Shu-Rong

Tel: 86 - 21 - 64370045 -
611006

E-mail: yzh-1975@yahoo.
com. cn

收稿日期 2002-06-13

修回日期 2002-12-31

【ABSTRACT】BACKGROUND & OBJECTIVE: The early diagnosis of pancreatic carcinoma is difficult. The serum tumor markers such as CA19-9 have a relatively high sensitivity but with low specificity. The oncogene K-ras is frequently mutated in pancreatic carcinoma and with high specificity. The aim of this study was to assess the feasibility of detection of K-ras mutation combined with serum content of CA19-9 as an approach for diagnosis of pancreatic carcinoma. **METHODS:** Serum DNA was extracted from 39 patients with pancreatic carcinoma. Mutation enriched polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) was used to determine codon 12 mutations of K-ras. Serum content of CA19-9 was determined by radioimmunoassay. In addition, the sera from 17 patients with other pancreatic diseases and 21 healthy individuals were also analyzed as control. **RESULTS:** K-ras gene mutations at codon 12 were detected in the sera of 71.79% (28/39) patients with pancreatic carcinoma and 11.76% (2/17) of patients with benign pancreatic tumors. The positive rates of CA19-9 were 71.79% and 41.18%, respectively. Parallel combined test increased the diagnostic sensitivity to 94.87%; and serial combined test increased the diagnostic specificity to 94.12%. Negative results of K-ras gene and CA19-9 were obtained in all sera from healthy controls. **CONCLUSION:** Combined detection of K-ras mutation and CA19-9 could increase the sensitivity and specificity in diagnosing pancreatic carcinoma, and would seem to be merited in clinic.

KEYWORDS: Pancreatic neoplasms; K-ras; CA19-9; Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)

【摘 要】 背景与目的: 胰腺癌早期诊断困难, 常用的肿瘤标记物如 CA19-9, 虽敏感度较高但特异性较差, 胰腺癌中常有 K-ras 基因的突变, 而且特异性较高, 我们通过检测血清 DNA 中 K-ras 基因的突变以及测定血清 CA19-9 的含量, 以探讨两者联合检测在胰腺癌诊断中的临床意义。方法: 取 39 例胰腺癌患者的血清, 抽提 DNA, 采用突变富集聚合酶链反应-限制性片段长度多态性法检测 K-ras 基因第 12 密码子突变, 同时应用放免法测定血清 CA19-9 的含量, 并与 17 例其他胰腺疾病患者和 21 例健康者的血清检测结果作对照, 分析两者联合应用的临床诊断价值。结果: 在 28 例胰腺癌和 2 例其它胰腺疾病患者血清中检测到 K-ras 基因突变, 阳性率分别为 71.79% 和 11.76%; 而血清 CA19-9 测定的阳性率则分别为 71.79% 和 41.18%。平行法联合检测 K-ras 和 CA19-9 诊断胰腺癌时敏感性增至 94.87%, 系列法联合检测时特异性增至 94.12%。21 例健康对照者血清中 K-ras 基因与 CA19-9 均无异常。结论: 联合血清 K-ras 基因突变检测与 CA19-9 测定可提高胰腺癌诊断的特异性和敏感性, 具有一定的临床应用价值。

关键词: 胰腺肿瘤; K-ras; CA19-9; 聚合酶链反应-限制性片段长度多态性法

中图分类号: R735.9 文献标识码: A

文章编号: 1000-467X(2003)03-0295-03

胰腺癌是一种高度恶性的肿瘤,其发病隐匿,绝大多数患者就诊时均属中晚期,确诊后平均生存期不到 5 个月,平均 5 年生存率低于 5%^[1]。因此,能否进行及时、准确的早期诊断是改善胰腺癌患者预后的关键因素。

近年来,以血清 CA19-9 测定和 K-ras 基因密码子 12 突变的检测诊断胰腺癌的报道较多,其临床应用价值已得到了初步肯定,但单独应用尚难以对胰腺癌作出全面可靠的诊断。本研究从病人血清中抽提 DNA,利用突变富集 (Mutation-Enriched) 聚合酶链反应-限制性片段长度多态性法 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 检测 K-ras 基因密码子 12 突变,同时应用放免法检测血清中的 CA19-9 的含量,以探讨两者联合应用对胰腺癌诊断的临床意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象

选取 1999 年 7 月至 2002 年 4 月间,瑞金医院外科收治的 56 例拟诊胰腺癌的病人。经术前 B 超、CT、ERCP 检查、手术探查以及术后病理诊断,其中 39 例确诊为胰腺癌,男性 30 例,女性 9 例,年龄 36~79 岁,中位年龄 64 岁。其余 17 例其它胰腺疾病者分别证实为慢性胰腺炎 15 例,胰腺囊腺瘤 1 例,胰交界粘液瘤 1 例。另选 21 名健康体检者作为对照(男:女为 11:10,年龄 30~60 岁,中位年龄 53 岁)。

1.2 方法

1.2.1 标本收集 术前 1 周抽取外周静脉血 3 ml,常温下 $2\,000 \times g$ 离心 15 min,分离血清, -70°C 保存备用。

1.2.2 血清 K-ras 基因第 12 密码子突变的检测 按 QIAamp Blood Kit (QIAGEN, Cat No. 29104, Germany) 操作步骤抽提 DNA。采用突变富集 PCR-RFLP 法,对 K-ras 基因第 12 密码子突变进行检测^[2]。简述如下,设计错配引物 P1、P2,对血清 DNA 进行第一次 PCR 扩增,以产生一个 *Mva* I 酶切位点。扩增产物经 *Mva* I 限制酶 (MBI Fermentas, ER0551) 酶切后,稀释 100 倍用 P2 及另一引物 P3 进行第二次 PCR,对产物进行 *Mva* I 限制酶酶切。取酶切产物进行高分辨率的 Metaphor 琼脂糖 (FMC Bioproducts, Cat No. 50181) 凝胶电泳分析。电泳结果出现 135bp 条带为突变阳性,106 条带为野生型酶切产物。

1.2.3 血清 CA19-9 测定 采用放免法(本院核医学实验室)进行测定。按试剂盒 (IKGI1 试剂盒,天津

德普生物技术和医学产品有限公司)说明设定正常值上限 30U/ml,超过正常值上限判定为阳性,反之则定为阴性。

1.2.4 统计处理 利用 SAS 软件 (6.12) 进行 χ^2 检验。

2 结果

2.1 血清 K-ras 突变检测结果

按突变富集 PCR-RFLP 法,当 K-ras 基因第 12 密码子发生突变时,PCR 富集产物 (135 bp) 不能被 *Mva* I 酶所酶切。而未发生突变时,酶切后的产物为 106 bp,见图 1。



图 1 突变富集 PCR-RFLP 法检测 K-ras 基因第 12 密码子突变电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis results of PCR-RFLP products for detection mutations at codon 12 of the K-ras gene. M: pBR322/Hae III Marker; Lane 1: normal control, digestion of 106 bp PCR fragment by *Mva* I; Lane 2: mutation of K-ras gene, 135 bp PCR fragment with the destroyed enzymatic cut site which can not be digested by *Mva* I.

2.2 血清 K-ras 突变结果与血清 CA19-9 检测结果比较

39 例胰腺癌患者中,检测出 K-ras 突变 28 例,血清 CA19-9 升高者 28 例,上述两项指标单独检测胰腺癌的敏感性均为 71.79%,特异性则分别为 88.24% 和 58.82%,系列联合法敏感性为 51.28%。K-ras 基因突变在胰腺癌中明显增加,与慢性胰腺炎等胰腺疾病 (11.76%) 相比差异有显著性 ($P < 0.001$)。CA19-9 值在胰腺癌中也明显升高 ($P < 0.05$),但在其它胰腺疾病中也有 41.18% 的阳性率,因此特异性相对较低。在对照组的血清中未检测到 K-ras 突变,CA19-9 测定值也在正常范围,见表 1。应用平行法联合检测 (即两项指标中有一项为阳性即为阳性) 可提

高检测的敏感度(94.87%)和阴性预测值(81.82%),但采用系列法联合检测(两项指标必须均为阳性)则提高了检测的特异度(94.12%)和阳性预测值(95.24%),但降低了敏感性和阴性预测值,见表2。

表1 血清 K-ras 突变检测结果和血清 CA19-9 检测结果

Tab. 1 Detection Results of K-ras Gene Mutation and CA19-9

Group	n	Serum K-ras		Serum CA19-9	
		Mutation	Positive rate(%)	Positive result (> 30U/ml)	Positive rate (%)
Pancreatic cancer	39	28	71.79 ^a	28	71.79 ^b
Benign pancreatic disease	17	2	11.76	7	41.18
Healthy control	21	0	0.00	0	0.00

Note a: K-ras mutation was obviously different between pancreatic carcinoma and benign pancreatic disease($\chi^2 = 17.2$ $P < 0.001$); b: CA19-9 positive rate was statistically different between pancreatic carcinoma and benign pancreatic disease($\chi^2 = 4.7$ $P < 0.05$)

表2 胰腺癌患者 K-ras 突变与 CA19-9 检测结果比较(%)

Tab. 2 Analysis of the Relationship between K-ras Gene Mutation and Elevated CA19-9 (%)

Detected method	Sensitivity	Specificity	Positive predictive value	Negative predictive value
K-ras	71.79	88.24	93.33	57.69
CA19-9	71.79	58.82	80.00	47.62
Parallel combined examination	94.87 ^a	92.94	82.22	81.82
Serial combined examination	51.28	94.12 ^b	95.24	45.71

Note a: The sensitivity of parallel combined examination is obviously higher than that of K-ras or CA19-9 detection($\chi^2 = 7.1$, $P < 0.01$); b: The specificity of serial combined examination is obviously higher than that of K-ras or CA19-9 detection($\chi^2 = 6.1$, $P < 0.05$)

3 讨 论

随着细胞和分子生物学研究的不断进展,许多胰腺癌相关的肿瘤标记物及敏感特异的基因标记相继被发现,其中以血清 CA19-9 测定和 K-ras 基因密码子 12 突变的检测最具代表性。前者在临床上已被广泛应用,在胰腺癌中明显升高,具有一定的诊断价值,但其在急、慢性胰腺炎、肝胆疾病以及胃肠道恶性肿瘤中都有超过 20% 的检出率,因此对胰腺癌诊断的特异性相对较低^[3]。另外,CA19-9 在早期胰腺癌中常不升高,因此单用 CA19-9 进行胰腺癌的筛查会造成较高的假阳性率与漏诊率。K-ras 癌基因则弥补了这方面的不足,K-ras 在胰腺癌患者中有 75%~95% 的突变率,且几乎都集中于第一外显子的 12 密码子,且被认为突变发生在胰腺癌的早期^[4],这使得检测 K-ras 基因第 12 密码子突变胰腺癌早期诊断成为可能。近年来有许多文献报道从胰腺癌患者

的各种标本(包括胰腺细针穿刺组织、胰液、十二指肠引流液以及血清)中检测 K-ras 基因第 12 密码子的突变来探讨对胰腺癌进行早期诊断的可能性。如 Mora 等^[5]以胰腺癌组织细针穿刺物为标本,用 PCR-RFLP 法进行 K-ras 突变检测,检测到 92% (11/12) 的突变率。Berthelemy 等^[6]用同样的方法检测 22 例胰腺癌患者纯胰液标本,突变率为 77%。Mulcahy 等^[7](对 21 例晚期胰腺癌患者的血样进行了检测,突变率为高达 81%。除血清标本外,其它方法因取材困难,难以在临床上推广。本研究中有 71.79% 的胰腺癌患者血清中可测到 K-ras 基因第 12 密码子的突变,而且特异性较高,与文献报道结果相近^[8]。本组胰腺癌患者血清 CA19-9 的阳性率亦为 71.79%,与 K-ras 结果的符合率为 51.28%,说明两者具有较大的互补性,当做平行联合检测时,可以提高胰腺癌诊断的敏感性和阴性预测值,减少漏诊的概率,由于特异性较差,此法较适用于门诊病人的筛选。而系列联合检测则可提高诊断的特异度和阳性预测值,提高诊断的正确性。如果血清 K-ras 基因突变和 CA19-9 均为阴性时,则胰腺癌的可能性极小(<5.13%)。我们认为可以将 K-ras 做为一种潜在的肿瘤标志物与 CA19-9 联合应用于胰腺癌的筛查中,这将使胰腺癌的早期诊断变得快速、准确、及时。

本研究还发现,K-ras 突变率在胰腺癌以外的其它胰腺疾病,远低于血清 CA19-9 阳性率。这提示 K-ras 突变检测可能对胰腺癌与良性胰腺疾病的鉴别诊断有帮助,但此方面的研究文献报道不一,尚有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Warsaw AL, Fernandez-del Castillo C. Pancreatic carcinoma [J]. N Engl J Med, 1992, 326(7): 455-465.
- [2] 奉典旭,韩天权,蒋 渝,等. 胰腺癌患者血浆 K-ras 基因突变检测的研究[J]. 中华外科杂志, 2000, 38(10): 767-770.
- [3] Schmieg W. Tumor markers in pancreatic cancer-current concepts[J]. Hepatogastroenterology, 1989, 36(6): 446-449.
- [4] Lemoine NR, Jain S, Hughes CM, et al. Ki-ras oncogene activation in preinvasive pancreatic cancer[J]. Gastroenterology, 1992, 102(1): 230-236.
- [5] Mora J, Puig P, Boadas J, et al. K-ras gene mutations in the diagnosis of fine-needle aspirates of pancreatic masses: prospective study using two techniques with different detection limits[J]. Clin Chem, 1998, 44(11): 2243-2248.
- [6] Berthelemy P, Bouisson M, Escourrou J, et al. Identification of K-ras mutations in pancreatic juice in the early diagnosis of pancreatic cancer[J]. Ann Intern Med, 1995, 123(3): 188-191.
- [7] Mulcahy HE, Lyautey J, Lederrey C, et al. A prospective study of K-ras mutations in the plasma of pancreatic cancer patients [J]. Clin Cancer Res, 1998, 4(2): 271-275.
- [8] Theodor L, Melzer E, Sologov M, et al. Detection of pancreatic carcinoma: Diagnostic value of K-ras mutations in circulating DNA from serum[J]. Dig Dis Sci, 1999, 44: 2014-2019.

[编辑及校对 杨允贵]