

# I 期结直肠癌转移基因突变特征及临床特征研究

陈荣 徐胜<sup>通讯作者</sup> 黄顺荣 庞黎明

广西壮族自治区人民医院 广西 南宁 530021

**【摘要】目的：**探讨 I 期结直肠癌转移基因突变特征及临床特征。**方法：**本研究选取 2017 年 1 月—2020 年 12 月我院收治的 60 例 I 期结直肠癌转移患者，另抽取同期住院治疗的 37 例 I 期结直肠癌未转移患者作为对照，两组患者均提取其肿瘤组织中的 DNA，行全外显子二代测序，分析转移患者基因突变特征；并调查患者一般资料，分析其临床特征。**结果：**I 期结直肠癌转移组患者结肠腺瘤样息肉病蛋白（APC）与 TP53 基因突变人数占比均高于未转移组，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）；本组 I 期结直肠癌发生转移患者与未转移患者在民族、年龄、原发部位、病理类型及化疗暴露等方面比较，差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）；转移患者中女性占比高于男性，分子亚型显示为微卫星稳定型患者占比高于微卫星不稳定型，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）。**结论：**I 期结直肠癌患者发生转移与 APC、TP53 等基因突变存在一定联系，且女性患者与微卫星稳定型患者发生癌细胞转移的风险更高。

**【关键词】** I 期结直肠癌；基因突变；临床特征；分子亚型；化疗暴露

**【中图分类号】** R735.3

**【文献标识码】** A

**【文章编号】** 2096-1685(2022)01-0046-04

结直肠癌（colorectal cancer, CRC）属于人体消化系统常见的恶性肿瘤，主要指腹部结肠及直肠部位组织发生癌变；该疾病以黏液血便、大便次数增多为主要临床表现<sup>[1]</sup>，随着肿瘤体积增大，肠道逐渐形成狭窄，进而可引发肠梗阻症状（如腹痛、腹胀、排气困难等）。近年来，随着临床对结直肠癌研究的深入及癌症筛查的发展，T1/T2 期结直肠癌病患发现比例显著提高，但有学者提出，临床有超过半数的确诊病例可发生癌细胞转移。还有研究认为，早期结直肠癌发生转移可能与基因突变存在密切联系<sup>[2]</sup>，故及早明确基因突变的特征具有重要意义。本研究对我院 I 期结直肠癌转移患者基因突变情况及临床资料进行分析，总结其特征，具体内容报告如下。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取 2017 年 1 月—2020 年 12 月我院收治的 60 例 I 期结直肠癌转移患者与同期 37 例 I 期结直肠癌未转移患者为观察对象，此项研究经医院伦理委员会批准。

纳入标准<sup>[3]</sup>：(1) 患者均符合 I 期结直肠癌临床诊断标准；(2) 未接受放疗、化疗等干预；(3) 患者均知晓认可此次试验并签署《知情同意书》。

排除标准<sup>[4]</sup>：(1) 合并重要脏器功能障碍者；(2) 临床资料不完整者；(3) 精神异常无法配合研究者；(4) 存在免疫系统疾病者。

### 1.2 方法

1.2.1 标本处理 所有患者经活检获取标本后立即借助中性福尔马林溶液进行固定，由专业病理检验人员按规范流程

取材，获得规格为 1cm×1cm×1cm 的组织块；再使用全自动脱水机（型号：LEICA ASP300S）对标本中梯度乙醇脱水、二甲苯透明，石蜡包埋后获得厚切片（4μm），HE 染色。由两名病理医师负责阅片，对肿瘤丰富区域（区域内肿瘤细胞比例超过 40%，确保肿瘤细胞数量可达 200~400 个）进行标识；基因检测选取的组织尽可能以肿瘤细胞为主，无明显坏死、黏液及炎性改变，以确保检测的准确性。

1.2.2 DNA 提取与 PCR 扩增 (1) DNA 提取：对临床病理医师标识的蜡块（10μm）进行连续切片，获得 5 张切片后黏附于载玻片，烤片后行梯度乙醇脱蜡至水，再小心转移至离心管内（1.5mL）；选用 APC、NRAS、TP53 及 BRAF 基因组 DNA 提取试剂盒，严格按照相关说明书开展 DNA 提取操作，并借助紫外分光光度计（型号：SMA4000，美林恒通）对所提取 DNA 的质量及纯度进行测量。(2) PCR 反应体系：10×PCR 缓冲液 2.5μL，dNTP（2.5mmol/L）3μL，上下游引物（10mmol/L）各 0.8μL，LA Taq 酶 0.1μL，DNA 模板 2μL，无菌水 13μL，总反应体系为 20μL。PCR 反应条件：95℃ 变性 5min；95℃ 25s，56℃ 退火 40s，72℃ 15s，共进行 46 个循环；72℃ 延伸 7min。

1.2.3 基因突变检测 肿瘤组织 DNA 成功采集并获取后，仪器选用 Illumina X10 测序仪，运用 NGS 方法开展全外显子二代测序；组织测序深度设置为 1000，ctDNA 测序深度设置为 3000。具体操作：(1) 构建 DNA 待测文库：而记住超声波打断大片的 DNA，选出合适的 DNA 片段（500~800bp），在小片段两端添加不同接头，构建单链 DNA

通讯作者：徐胜，E-mail：357329032@qq.com。

文库。(2) Flowcell :文库构建完成后,文库内 DNA 在通过 flowcell 时可随机附着于 flowcell 表面的 channel 上。每个 channel 表面均有多个接头,这些接头可与 DNA 片段两端的接头相互配对,以支持 DNA 在其表面开展 PCR 的扩增。(3) 桥式 PCR 扩增与变性 :选择 Flowcell 表面所固定的接头作为模板,开展桥形扩增。(4) 测序 :依次加入四种不同碱基,每当有一个或数个碱基掺入新和成的序列时,就会释放出一个氢离子,发出一次光信号,借助信号采集系统获得 DNA 序列。最后,由专业医师将测序所得结果与结直肠癌基因库序列进行对比分析,判定 APC、NRAS、TP53 及 BRAF 等基因是否存在

突变。

1.3 统计学处理

本研究采用 SPSS 20.0 统计软件对本文数据进行分析,计量资料以( $\bar{x} \pm s$ )表示、行  $t$  检验,计数资料以百分率(%)表示,行  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组患者基因突变情况

I 期结直肠癌转移组患者 APC、TP53 基因突变人数占比均高于未转移组 ( $P < 0.05$ ),如表 1 所示。

表 1 两组患者基因突变情况比较 [n(%)]

| 组别   | n  | APC 基因突变   | NRAS 基因突变  | TP53 基因突变  | BRAF 基因突变  |
|------|----|------------|------------|------------|------------|
| 转移组  | 60 | 6 (10.00)  | 1 (1.67)   | 10 (16.67) | 2 (3.33)   |
| 未转移组 | 37 | 0 (0.00)   | 0 (0.00)   | 1 (2.70)   | 0 (0.00)   |
| t    | —  | 3.944      | 0.623      | 4.439      | 1.259      |
| P    | —  | $P < 0.05$ | $P > 0.05$ | $P < 0.05$ | $P > 0.05$ |

2.2 两组患者一般资料临床特征分析

60 例 I 期结直肠癌发生转移患者在民族、年龄、原发部位、病理类型及化疗暴露等方面与未转移患者比较,差异无统

计学意义 ( $P > 0.05$ ) ;转移患者中女性占比高于男性 ;分子亚型显示,微卫星稳定型患者占比高于微卫星不稳定型,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),如表 2 所示。

表 2 两组患者一般资料临床特征分析

| 特征   | 例数          | 转移 (n=60) | 未转移 (n=37) | $\chi^2$ | P          |
|------|-------------|-----------|------------|----------|------------|
| 年龄   | $\geq 45$ 岁 | 63        | 39         | 1.151    | $P > 0.05$ |
|      | $\leq 45$ 岁 | 34        | 21         |          |            |
| 性别   | 男           | 55        | 25         | 14.482   | $P < 0.05$ |
|      | 女           | 42        | 35         |          |            |
| 原发部位 | 左半结肠及直肠     | 54        | 36         | 1.195    | $P > 0.05$ |
|      | 右半直肠        | 43        | 24         |          |            |
| 病理类型 | 腺癌          | 35        | 18         | 2.523    | $P > 0.05$ |
|      | 非腺癌         | 62        | 42         |          |            |
| 分子亚型 | 微卫星不稳定型     | 9         | 0          | 16.087   | $P < 0.05$ |
|      | 微卫星稳定型      | 88        | 60         |          |            |
| 化疗暴露 | 是           | 36        | 21         | 0.301    | $P > 0.05$ |
|      | 否           | 61        | 39         |          |            |
| 民族   | 汉族          | 78        | 42         | 0.009    | $P > 0.05$ |
|      | 回族          | 19        | 10         |          |            |

3 讨论

结直肠癌目前已居于高发癌症病变的第二位,仅次于肺癌 ;其主要临床特点为低龄化、低位病变占比高、早期确诊率低等,严重威胁人们的生命健康<sup>[5]</sup>。临床大部分患者确诊时已进展至中晚期,多采取手术切除病灶治疗方式。但癌症早期发现仍有助于患者及早接受治疗、以改善其预后。但结直肠癌属于多基因参与的复杂疾病,患者个体较大的差异性导致早期靶点药物治疗缺乏精准性,从而影响治疗成效。因此,临床分析 I 期结直肠癌转移患者的基因突变特征显得尤为重要。

有报道指出,结直肠癌的发生及发展与多个癌基因的激活或抑癌基因的失活密切相关<sup>[6]</sup>。APC 基因属于 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路负向调节的关键因子,APC 失活是临床早期结直肠癌常见的分子事件。有相关数据显示,在散发性结直肠癌中,

约有 75% 存在 APC 基因缺失或突变,从而生成截短型 APC 蛋白,导致 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路被激活,对细胞迁移、染色体分离及转录调节等方面发挥作用<sup>[7-8]</sup>。APC 可与 DNA 产生直接相互作用,其通过对 DNA 复制产生抑制作用,以达到调控细胞周期的目的。APC 基因还对长链非编码 RNA 的表达具有良好调节作用,以降低外泌体的含量,有效抑制癌细胞的增殖、侵袭及血管生成,从而阻碍结直肠癌的发病及病情进展。I 期结直肠癌转移组患者 APC 基因突变人数占比为 10.00% 高于未转移组 (0.00%),差异有统计学意义 ;提示 APC 基因突变的 CRC 患者肿瘤恶性程度可能更高。P53 属于肿瘤抑制基因,有半数以上的恶性肿瘤疾病能观察到该基因发生突变,故 TP53 是临床恶性肿瘤中最常见的突变基因。有研究结果指出,血清 P53 抗体在结直肠癌中阳性率高达

40.2%,而非结直肠癌中仅为2.9%,这一结果表明血清 P53 抗体与结直肠癌密切相关,可作为辅助性诊断指标<sup>[9]</sup>。还有学者发现,不同大小的肿瘤中 TP53 阳性表达率存在显著差异,说明 TP53 高表达与肿瘤高侵袭性密切相关;不同淋巴转移分组 TP53 阳性表达率也存在明显差异,提示 TP53 高表达与肿瘤的转移能力也具有相关性<sup>[10]</sup>;这与本研究中 I 期结直肠癌转移组患者 TP53 基因突变人数占比均高于未转移组(差异有统计学意义)的结果相一致,充分说明该基因可作为预测结直肠癌是否发生转移的重要指标。CRC 的发生发展受多因素、多基因、多个信号通路影响,其中表皮生长因子(EGFR)信号通路与 CRC 的发生发展密切相关<sup>[11]</sup>。近年来,靶向治疗不断发展,临床针对 CRC 患者所研制的西妥昔单抗、帕尼单抗等抗 EGFR 单克隆抗体药物,使患者总体生存率得到明显提高。而 RAS 家族或 BRAF 基因的突变可将下游 RAS—RAF—MAPK 通路持续性激活,导致抗 EGFR 单克隆抗体用于 CRC 患者治疗中疗效欠佳。刘威、王菲、杜洪<sup>[12]</sup>等学者研究中也指出, KRAS 基因与 BRAF 基因作为 EGFR 信号通路下游关键分子,与临床抗 EGFR 治疗的耐药性存在一定相关性;提示 CRC 患者治疗前常规开展 KRAS 基因与 BRAF 基因突变的检测,对于 EGFR 靶向药物的使用及患者预后具有重要意义。NRAS 基因属于 RAS 基因家族中的一员,当 KRAS 基因发生突变时,人体细胞内信号传导处于紊乱状态,导致患者结肠部位细胞不断生长、无限增殖,最终引发癌变。但 KRAS 突变在早期结直肠癌患者中并不显著,其主要作为临床结直肠癌肝转移患者接受肝切除手术的预后因素。相关研究指出, KRAS 突变状态对于结直肠癌靶向药物的治疗效果具有重要指导意义<sup>[13-14]</sup>。BRAF 基因编码是一种丝/苏氨酸特异性激酶,其对细胞的多种生物学过程(包括生长、增殖、分化及凋亡等)均参与调控, BRAF 基因突变状态与肿瘤的发生、发展及临床预后密切相关。其中 V600E 突变属于 BRAF 基因最常见的突变类型。BRAF V600E 基因突变可对结直肠癌细胞的增殖、分化及凋亡均产生影响,从而达到促进 CRC 患者病情进展的目的。还有报道显示, BRAF 基因突变型患者的无病生存期和总生存期明显缩短,该基因突变状态是结直肠癌的独立预后因素<sup>[15]</sup>。本研究结果显示,转移患者中女性占比高于男性,分子亚型显示为微卫星稳定型患者占比高于微卫星不稳定型,差异有统计学意义;提示女性结直肠癌患者发生转移的风险较高,微卫星稳定型患者癌细胞更容易发生转移。不过,本研究也存在一定局限性(例如研究样本数量过少、缺乏临床特征的分类),故今后临床可进一步扩大研究样本数量,纳入更多临床特征的分类等,更加深入分析 I 期结直肠癌转移患者的基因突变情况及临床特征。

综上所述, I 期结直肠癌患者发生转移与 APC、TP53 等基因突变存在一定联系,且女性患者与微卫星稳定型患者出现癌细胞转移的可能性更大,更多基本突变与临床特征的相关性

仍有待临床进一步深入分析。

### 参考文献

- [1] SONG L L, HAN X K, ZHANG J, et al. Body image mediates the effect of stoma status on psychological distress and quality of life in patients with colorectal cancer[J]. *Psycho-oncology*,2020,29(4):796-802.
- [2] 范士民,何桦,赵凯. 结直肠癌长链非编码 RNA CASC11 和原癌基因 c-myc 的表达及其与复发转移的关系[J]. *肿瘤研究与临床*,2021,33(6):445-451.
- [3] 赵龙,周静,赵世栋,等. 结直肠癌关键基因突变与患者的临床病理特征和预后的关系[J]. *中华普通外科杂志*,2020,35(12):924-931.
- [4] 孙耀华,汪润秋,赵静,等. 结直肠癌组织中 KRAS、NRAS 及 BRAF 基因突变状态与临床病理特征的关系[J]. *郑州大学学报(医学版)*,2021,56(1):53-57.
- [5] LUO R, ZHENG F F, ZHANG H B, et al. Robotic natural orifice specimen extraction surgery versus traditional robotic-assisted surgery (NOTR) for patients with colorectal cancer: a study protocol for a randomized controlled trial[J]. *Trials*,2021.
- [6] 白杨,吴林林,安建多,等. 结直肠癌组织中 KRAS、NRAS、BRAF、PIK3CA 基因突变与临床病理特征及 MMR 蛋白、p53 蛋白表达的相关性研究[J]. *诊断病理学杂志*,2021,28(3):183-188,193.
- [7] 顾冬梅,覃玲艳,干文娟,等. 结直肠癌组织中 APC、 $\beta$ -catenin 和 COX-2 的表达及临床意义[J]. *临床与实验病理学杂志*,2020,36(4):452-454,457.
- [8] 李娟,白瑞,潘月龙. I 期结直肠癌转移基因突变特征及临床特征分析[J]. *浙江中西医结合杂志*,2021,31(7):664-668.
- [9] PRATIBHA B, KULSHRESTHA S, RATNA D P., et al. Spectrum of mutations in genes associated with familial colorectal cancer syndrome (MLH1, MSH2, PMS2, MSH6, and APC): A not so common hereditary cancer syndrome in Indian population[J]. *Indian Journal of Gastroenterology*,2020,39(6):599-607.
- [10] 侯悦,李少波,师晓琴,等. 结直肠癌 KRAS、NRAS 和 BRAF 基因突变与临床病理特征的回顾性分析[J]. *上海交通大学学报(医学版)*,2018,38(1):4-9.
- [11] 曹跃鹏,刘东方,陶勇,等. 结直肠癌组织高频突变基因与临床病理特征及 MMR 基因突变的相关性分析[J]. *现代实用医学*,2021,33(9):1167-1170.
- [12] 刘威,王菲,杜洪,等. KRAS、BRAF 基因突变的结直肠癌患者临床病理特征分析[J]. *广州医科大学学报*,2021,49(4):13-18.

(下转第 48 页)

## 3 讨论

盆腔器官脱垂是临床上一种常见妇科病症,多发于中老年群体<sup>[8]</sup>。近年来随着老龄化进程加剧,导致中老年群体该病症人数不断增多<sup>[9]</sup>,严重影响患者生活质量。该疾病患者患病后症状较为明显<sup>[10]</sup>,如患者可见阴道前壁膨出、排尿困难、阴道组织物脱出等症状,患者容易产生明显焦虑抑郁情绪<sup>[11]</sup>,需要及时接受治疗。临床传统治疗主要选择手术治疗,但手术对患者产生的负面影响较为明显<sup>[12]</sup>,如阴道前壁黏膜瓣悬吊术,患者术后疼痛感较为明显,且并发症发生率较高<sup>[13]</sup>;近年来,临床提出了经阴道子宫切除联合双侧宫骶韧带悬吊术治疗,该治疗方式效果较为显著<sup>[14]</sup>,患者术后恢复速度较快,可有效改善患者临床症状,降低患者并发症发生率,促使患者及早恢复健康,应用价值较高。

本次研究结果中,观察组各项指标(手术时间、导尿管留置时间、术中出血量、住院时间)均优于对照组( $P < 0.05$ ),说明该手术治疗效果显著,可有效改善患者临床症状,促使患者及早康复。两组患者VAS评分治疗前无显著差异( $P > 0.05$ ),治疗后观察组评分优于对照组( $P < 0.05$ );说明该治疗方式可有效改善患者疼痛情况,降低患者身体应激反应,效果较为显著。两组患者治疗前PFIQ-7、PFD1-20评分无显著差异( $P > 0.05$ ),治疗后(治疗半年、治疗一年)观察组各项评分均优于对照组( $P < 0.05$ );说明该治疗方式可有效改善患者盆底功能,进而提升患者生活质量,加速各项功能的恢复。观察组显效率优于对照组( $P < 0.05$ ),说明该治疗方式效果显著,可及时控制患者病症,促使患者症状得到及时控制,早日恢复健康。观察组并发症发生率低于对照组( $P < 0.05$ ),说明该治疗方式安全性更高,可有效降低并发症发生率,促使患者早恢复。

综上所述,中老年妇女中重度盆腔器官脱垂开展经阴道子宫切除联合双侧宫骶韧带悬吊术治疗效果较为显著,可有效改善患者病症,优化盆底功能,以降低患者术后并发症发生率,促使患者及早恢复健康,值得推广。

## 参考文献

- [1] 宋佼洋,孙秀丽.高位宫骶韧带悬吊术在盆底重建中的应用[J].中国实用妇科与产科杂志,2021,37(12):1202-1205.  
[2] 沈文洁,鲁永鲜,刘昕.经阴道高位宫骶韧带悬吊术治疗复发性盆腔器官脱垂的疗效分析[J].中华妇产科杂志

志,2019(4):232-238.

[3] 黄永芳,张文纓,吴琼蔚.腹腔镜下高位宫骶韧带悬吊术治疗盆腔器官脱垂疗效分析[J].中国初级卫生保健,2021,35(8):84-87.

[4] 丁成玉,王小娇,张海娟.腹腔镜高位宫骶韧带悬吊术治疗子宫脱垂的临床效果[J].中国当代医药,2021,28(20):130-132.

[5] 范水秀,王凤玫,林丽莎.盆底修复手术后复发81例的再治疗方法及疗效分析[J].中华妇产科杂志,2017,52(6):374-378.

[6] 徐东艳,赵艳丽,张晶.阴道顶端右侧骶棘韧带悬吊术在盆腔器官脱垂治疗中的临床价值研究[J].实用妇科内分泌杂志(电子版),2018,5(35):46,49.

[7] 吴伟英,方梓羽,马艳群,等.经阴道子宫切除术、阴道壁修补术联合腹腔镜骶棘韧带固定术治疗盆腔器官脱垂[J].山东医药,2018,58(19):45-47.

[8] 梁诗琪,陈春林,刘萍.盆腔器官脱垂患者宫骶韧带与输尿管、直肠解剖关系的MRI三维重建研究[J].中华妇产科杂志,2021,56(1):27-33.

[9] 黄亮.经阴道子宫切除术、阴道壁修补术联合腹腔镜经阴道骶棘韧带固定术治疗盆腔器官脱垂临床观察[J].临床医学,2019,39(6):44-45.

[10] 刘晓碧,张冬霞.经阴道子宫切除术联合阴道前后壁修补术治疗盆腔器官脱垂的临床效果[J].临床医学研究与实践,2020,5(20):90-92.

[11] 王海波,李萍.改良经阴道子宫切除术联合阴道前后壁修补术治疗中老年肥胖患者中重度盆腔器官脱垂的效果观察[J].临床误诊误治,2020,33(6):76-81.

[12] 佛新艳,李萍.经阴道子宫切除联合阴道前后壁修补术对盆腔器官脱垂患者生活质量及盆底功能的影响[J].临床和实验医学杂志,2019,18(16):1778-1781.

[13] 李玲,李惠敏,付明英.经阴道网片植入盆底重建术治疗盆腔器官脱垂(POP)的应用效果与性功能评价[J].中国性科学,2020,29(2):65-68.

[14] 柏春霞,史红梅,惠彩玲.盆底悬吊术与传统经阴道子宫切除术治疗盆底功能障碍性疾病的疗效对比[J].贵州医药,2019,43(12):1893-1895.

(上接第51页)

[13] 刘媛,陈小萌,姚宏伟,等.不同结直肠癌共识分子分型临床特点分析[J].国际外科学杂志,2020,47(8):549-554, f4.

[14] HENDRICKS A, ROSENSTIEL P, HINZ S, et al. Rapid response of stage IV colorectal cancer with APC/TP53/KRAS mutations to FOLFIRI and Bevacizumab combination

chemotherapy: a case report of use of liquid biopsy[J]. BMC Medical Genetics, 2020.

[15] 潘理会,李育庄,李春辉.结直肠癌中KRAS、NRAS基因突变与临床病理特征的关系[J].中国老年学杂志,2019,39(9):2110-2113.