

# 结直肠癌 KRAS 基因突变检测专家共识

卫生部病理质控与评价中心 结直肠癌 KRAS 基因突变检测专家组

全球结直肠癌每年新发病例数约 120 万,年病死人数超过 60 万,发病率居第 3 位,病死率居第 4 位<sup>[1]</sup>。近些年,结直肠癌的发病率呈明显上升趋势<sup>[1]</sup>。因此,结直肠癌的治疗一直是国内外学者研究的热点。随着靶向治疗药物表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂西妥昔单抗(Cetuximab)和帕尼单抗(Panitumumab)的问世,结直肠癌的治疗进入了靶向治疗时代。

多个大样本、多中心 III 期临床研究结果提示, KRAS 基因第 2 号外显子第 12、13 位密码子的突变状态与阻断 EGFR 的单克隆抗体——西妥昔单抗、帕尼单抗的疗效明确相关, KRAS 野生型的患者可以从西妥昔单抗和帕尼单抗的治疗中获得最大化的生存效益,从此结直肠癌的治疗揭开了个体化治疗的新篇章<sup>[2-5]</sup>。早在 2009 年,美国临床肿瘤学会(ASCO)即建议对于转移性结直肠癌患者,在选择抗 EGFR 的单抗药物(西妥昔单抗或帕尼单抗)治疗前应检测 KRAS 基因状态<sup>[6-8]</sup>。美国《国家综合癌症网络(NCCN)结直肠癌临床实践指南》(2011 年)也指出,使用西妥昔单抗或帕尼单抗的患者应检测肿瘤 KRAS 基因突变状态。中国卫生部颁布的《结直肠癌诊疗规范(2010 年版)》中推荐西妥昔单抗用于治疗 KRAS 基因状态野生型患者。

目前有关 KRAS 基因突变的检测方法很多<sup>[9-12]</sup>,参与检测的机构众多,缺乏统一的标准,本文旨在就现有的 KRAS 的检测流程以及常用检测方法给予简要介绍和评价,为临床病理工作提供指导。

## 一、检测标本

1. 标本类型:(1)手术切除的标本:新鲜组织和(或)石蜡包埋组织;(2)肠镜等活检标本;手术切除标本及活检标本均具有的病例,建议用手术切除标本进行检测;(3)血液:应用血液标本进行检测目前尚处于研究阶段,不推荐应用。

2. 标本处理:(1)新鲜组织直接提取 DNA。(2)石蜡包埋组织的标本处理:所有标本离体后及时进行标记、切开、固定等处理。应用新鲜配制的 4% 中性甲醛缓冲液固定标本,避免使用 Bouin 液等含重金属离子的固定液。固定液的量应至少为组织体积的 10 倍。活检标本固定 6~12 h,手术标本固定 6~48 h。固定温度以正常室温为宜。蜡块保存温度在 32℃ 以下。

## 二、检测方法

1. 组织获取:所有标本进行基因突变检测前均先行常规病理检查和诊断(HE 染色),必须经有经验的病理医师确定健康肿瘤细胞的百分比(肿瘤细胞/整张切片所有细胞,估算),必要时应采取富集肿瘤细胞的方法,如手工刮取(macrodissection)或显微切割法(microdissection)。选取以肿瘤细胞为主的、没有明显的坏死、黏液和炎性改变的组织进行检测。肿瘤细胞数量要求尚无统一标准,至少应有 100 个肿瘤细胞,具体视所用 DNA 提取方法和突变检测方法的敏感度等而定。

2. DNA 提取:DNA 的质量很重要,一定要按标准的操作程序提取 DNA,并进行严格的质控。目前没有统一的标准方法,对于手术标本,可采用常规的商品化 DNA 提取试剂盒。对于活检标本,推荐使用能提取石蜡包埋组织微量 DNA 的试剂盒。提取的 DNA 建议先测定浓度,并进行质量评估后再用于基因突变检测。

3. 突变检测方法:方法很多,目前没有统一标准,各实验室可以根据实际情况选择应用,同时应充分了解所用检测方法的优缺点及局限性。所有方法建立前应进行有效性验证。表 1 中列出了 KRAS 基因常见的突变类型。

表 1 KRAS 基因常见突变类型

密码子	突变类型	碱基改变
第 12 位密码子	Gly12Asp	35G > A
	Gly12Ala	35G > C
	Gly12Val	35G > T
	Gly12Ser	34G > A
	Gly12Arg	34G > C
	Gly12Cys	34G > T
第 13 位密码子	Gly13Asp	38G > A

(1)直接测序(direct sequencing)法:是目前应用最多的一种检测方法,主要是 Sanger 测序法。其基本原理是进行 DNA 合成反应时,正常掺入 dNTP(dATP、dGTP、dCTP、dTTP)会使 DNA 链延伸,如果掺入 dideoxynTP(ddNTP),则会使 DNA 链延伸终止。DNA 片段是荧光标记的,这些片段经过平板胶电泳或毛细管电泳得到分离,荧光分子被激发而发光,发出的光信号可被检测系统检测。突变基因需要超过 20% 才能检测到突变信号。优点是能检测到已知突变和未知突变位点。但操作步骤多,检测周期较长。

(2)荧光即时定量 PCR 法(real-time PCR):通过检测荧光,实时监测 PCR 反应进行的过程。基于 real-time PCR 的方法较多,下面就两种常见的技术方法做简要介绍。

①ARMS(amplification refractory mutation system)法:该方法是利用与荧光探针相连的特定引物(蝎形或环形)进行的即时定量 PCR。通过将与探针部的突变部位结合的邻近碱基(第 2 个碱基)与错配的碱基替换,并与阻断延伸反应的“ARMS”技术结合,提高特异性,从而可以进行高灵敏度测定。灵敏度 1% 左右,只能检测已知突变位点。②Taqman 探针法:在 real-time PCR 反应中加入特异的 KRAS 野生型和突变型探针,通过特异性扩增曲线判读基因是否突变。灵敏度 1% 左右,只能检测已知突变位点。

三、质量控制和保证

美国病理学家协会(CAP)目前提出的检测方法主要为直接测序法、ARMS 法及 Taqman 探针法等。2010 年 8 月在北京召开了约 20 家病理实验室负责人参加的讨论会,与会专家讨论认为国内应用于 KRAS 突变检测的方法主要也是 CAP 提出的 3 种方法。

按照 ASCO 暂定的临床意见,KRAS 基因突变检测应在 CLIA(Clinical Laboratory Improvement Amendment Accredited Laboratory)认可的实验室进行,但国内尚无此类实验室,故初步要求如下:

1. 必须在有质量控制及质量保证(QC/QA)的实验室进行检测,实验室应建立完善的标准化操作程序(SOP)。
2. 所有检测必须严格按该方法的 SOP 要求进行。
3. 每种检测方法建立前需进行有效性验证,选择 2~3 个或更多有质量保证的中心实验室进行对比验证,一致性应 >90%。
4. 每年应定期进行 1~2 次内部及外部质评。
5. 进行检测的技术人员及医师必须经过必要的培训及考核。

6. 检测相关的仪器设备必须定期维护和校验。

7. 留存可溯源样本供质控参比验证。

四、申请单

申请单应包含以下基本内容:

1. 患者基本信息及病理诊断;
2. 标本性状及类型;
3. 临床资料、家族史和治疗史;
4. 知情同意签字和电话;
5. 要检测基因项目和方法。

五、检测报告

检测报告时间需 5~10 个工作日,如需重复检测,时间相应延长。

突变检测报告应包含以下内容:

1. 患者基本信息及病理诊断;
2. 标本性状及类型;
3. 标本质量及大小;
4. 获取的肿瘤细胞数量及所占细胞总数的百分比;
5. DNA 提取方法及突变检测方法;
6. 检测结果:KRAS 基因野生型,未检测到 KRAS 基因目标位点突变;KRAS 基因突变型,详细报告突变位点和密码

子类型;

7. 诊断性报告:应保存或附上可溯源的原始检测图谱,诊断医师在报告单上签字。

结直肠癌 KRAS 基因突变检测专家组人员(姓名按汉语拼音字母顺序排列):杜祥(复旦大学附属肿瘤医院病理科),侯英勇(复旦大学附属中山医院病理科),赖仁胜(江苏省中医院病理科),梁智勇(中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院病理科),刘彤华(中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院病理科),刘艳辉(广东省人民医院病理医学部病理科),毛峥嵘(浙江大学医学院病理学与病理生理学系),邵建永(中山大学肿瘤防治中心),孙文勇(浙江省肿瘤医院病理科),王建东(南京军区南京总医院病理科),王连唐(中山大学附属第一医院病理科),薛卫成(北京肿瘤医院病理科),应建明(中国医学科学院北京协和医学院肿瘤医院病理科),曾瑄(中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院病理科),张俊(上海交通大学医学院附属瑞金医院胃肠外科),郑建明(第二军医大学附属长海医院病理科),周晓燕(复旦大学附属肿瘤医院病理科)

参 考 文 献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90.
- [2] Soulières D, Greer W, Magliocco AM, et al. KRAS mutation testing in the treatment of metastatic colorectal cancer with anti-EGFR therapies. Curr Oncol, 2010, 17 Suppl 1:S31-S40.
- [3] Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. N Engl J Med, 2008, 359(17):1757-1765.
- [4] Amado RG, Wolf M, Peeters M, et al. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol, 2008, 26(10):1626-1634.
- [5] Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. N Engl J Med, 2008, 359(17):1757-1765.
- [6] Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. J Clin Oncol, 2009, 27(12):2091-2096.
- [7] Wierzbicki R, Jonker DJ, Moore MJ, et al. A phase II, multicenter study of cetuximab monotherapy in patients with refractory, metastatic colorectal carcinoma with absent epidermal growth factor receptor immunostaining. Invest New Drugs, 2011, 29(1):167-174.
- [8] Krens LL, Baas JM, Gelderblom H, et al. Therapeutic modulation of k-ras signaling in colorectal cancer. Drug Discov Today, 2010, 15(13-14):502-516.
- [9] Smith G, Bounds R, Wolf H, et al. Activating K-ras mutations outwith ‘hotspot’ codons in sporadic colorectal tumours-implications for personalised cancer medicine. Br J Cancer, 2010, 102(4):693-703.
- [10] Plessec TP, Hunt JL. KRAS mutation testing in colorectal cancer. Adv Anat Pathol, 2009, 16(4):196-203.
- [11] Franklin WA, Haney J, Sugita M, et al. KRAS mutation: comparison of testing methods and tissue sampling techniques in colon cancer. J Mol Diagn, 2010, 12(1):43-50.
- [12] 王志永,刘彤华,陈杰,等. 结肠黏膜、腺瘤和腺癌组织中Ki-ras 癌基因突变的检测. 中华病理学杂志,1993,22(6):333-336.

(收稿日期:2012-05-10)

( 本 文 编 辑 : 常 秀 青 )