

结直肠癌*k-ras*基因检测及其靶向治疗的研究现状

王丽, 余英豪

■背景资料

在结直肠癌的靶向治疗中, 抗EGFR单抗类药物能特异性地抑制具有野生型*k-ras*基因的结直肠癌细胞的生长, 使患者预后得到改善, 但对突变型*k-ras*基因的结直肠癌患者无效。

王丽, 余英豪, 中国人民解放军南京军区福州总医院病理科
福建省福州市 350025

作者贡献分布: 本文综述由王丽完成; 余英豪审校。

通讯作者: 余英豪, 主任医师, 教授, 350025, 中国人民解放军南京军区福州总医院病理科. yuyinghao0808@126.com
电话: 0591-83717703

收稿日期: 2010-09-28 修回日期: 2010-12-08

接受日期: 2010-12-15 在线出版日期: 2011-01-08

Recent advances in detection of *k-ras* gene mutations and targeted therapy of colorectal cancer

Li Wang, Ying-Hao Yu

Li Wang, Ying-Hao Yu, Department of Pathology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China

Correspondence to: Professor Ying-Hao Yu, Department of Pathology, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command of Chinese PLA, Fuzhou 350025, Fujian Province, China. yuyinghao0808@126.com

Received: 2010-09-28 Revised: 2010-12-08

Accepted: 2010-12-15 Published online: 2011-01-08

Abstract

Numerous studies have shown that anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) monoclonal antibodies are effective in the treatment of colorectal cancer patients with the wild-type *k-ras* gene. The *k-ras* gene encodes a G-protein that functions downstream of EGFR signaling. Since *k-ras* mutations result in abnormal activation of the EGFR signaling pathway, anti-EGFR monoclonal antibody treatment is ineffective for patients with *k-ras* mutations. Therefore, *k-ras* mutation analysis is very important for targeted therapy of patients with colorectal cancer. This paper gives an overview of the recent advances in detection of *k-ras* gene mutations and targeted therapy of colorectal cancer.

Key Words: Colorectal cancer; *k-ras* gene; Mutation; Targeted therapy; Detection Method

Wang L, Yu YH. Recent advances in detection of *k-ras* gene mutations and targeted therapy of colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(1): 62-67

■同行评议者

颜宏利, 教授, 中国人民解放军第二军医大学遗传学教研室

摘要

越来越多的研究表明, EGFR单抗对*k-ras*基因野生型结直肠癌患者治疗有效。*k-ras*基因编码的K-ras蛋白为EGFR信号通路下游区的一种小分子G蛋白, *k-ras*基因发生突变后, 导致该信号通路异常活化, 从而对EGFR单抗治疗无效。因此, 检测*k-ras*基因状态对指导结直肠癌患者靶向治疗十分重要。本文就*k-ras*基因检测方法及其与结直肠癌靶向治疗的研究现状进行综述。

关键词: 结直肠癌; *k-ras*基因; 突变; 靶向治疗; 检测方法

王丽, 余英豪. 结直肠癌*k-ras*基因检测及其靶向治疗的研究现状. 世界华人消化杂志 2011; 19(1): 62-67

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/62.asp>

0 引言

结直肠癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一。在美国, 结直肠癌的发病率和死亡率均居所有肿瘤的第3位, 其中男性发病率和死亡率分别为59.2/10万和22.7/10万, 女性发病率和死亡率分别为43.8/10万和15.9/10万^[1]。在我国结直肠癌的发病率和死亡率也日益上升, 目前居第4位^[2], 在大城市中每年以4%的增长速度上升^[3], 随着人们生活方式、饮食结构的改变, 平均寿命的提高, 结直肠癌的发病率可能还将进一步上升。有数据显示, 结直肠癌全世界每年新发120万例, 患者确诊后5年存活率仅为55%^[4], 且约有20%的患者在初诊时即发现有远处脏器的转移^[5]。近年来, 随着新的分子靶向药物的研发和个体化治疗的应用, 使转移性结直肠癌患者的存活率有了显著改善。人们逐渐认识到靶向药物治疗与相关基因检测之间的密切联系, 因此, 对结直肠癌的分子生物学及分子靶向治疗的研究已成为目前肿瘤治疗及预后判断的热点之一。越来越多的学者将目光投向了*k-ras*基因检测与结直肠癌关系方面并取得了一定进展。本文重点就*k-ras*基因与结直肠癌及其靶向治疗的关系以及*k-ras*基因检测方法学的研究现状进行综述。

1 *k-ras*基因概述

*ras*癌基因参与人类肿瘤的发生发展,最初是在急性转化性逆转录病毒实验中从Harvey、Kirsten两株大鼠肉瘤病毒中克隆出来的转化基因,自1982年有学者发现人膀胱癌细胞中有活化的*h-ras*基因后,引起了人们对*ras*癌基因在人类肿瘤发生发展过程中作用的极大关注^[6]。*ras*基因家族与人类肿瘤相关的基因有3种:*h-ras*、*k-ras*和*n-ras*,分别定位于11、12和1号染色体上。其中,*k-ras*突变率最高,为17%-25%^[7]。*k-ras*基因亦是所有肿瘤中突变频率最高的致癌基因,约有10%-20%的肿瘤与*k-ras*的异常激活有关,*k-ras*的突变激活是人类多种肿瘤细胞恶性转化的主要原因之一^[8],有如分子开关,正常时能控制调控细胞生长的路径;发生异常时则导致细胞持续生长。当*k-ras*基因突变时,该基因永久活化,不能产生正常的K-ras蛋白,使细胞内信号传导紊乱,细胞增殖失控而导致癌变的发生。

*k-ras*基因位于12号染色体上,含有4个编码的外显子和一个5'末端不表达的外显子,编码由189个氨基酸组成的结构相似,具有GTP酶活性,相对分子质量为21 000 Da的K-ras蛋白,又称为P21蛋白^[9]。P21蛋白以有活性的P21-GTP与无活性的P21-GDP两种形式存在于细胞膜内表面,*k-ras*基因突变后其编码的P21蛋白GTP酶活性降低,当细胞外配体与跨膜细胞受体结合后激活下游信号传导通路级联反应,P21蛋白与GTP结合,P21蛋白水解有活性的P21-GTP为无活性的P21-GDP能力下降,P21与GTP牢固结合,结果使得信号传导一直处于激活状态,持续刺激细胞生长、发育、增殖,并引起细胞恶变^[10]。

2 结直肠癌靶向治疗的理论基础

近几年靶向药物的出现为肿瘤的治疗带来了更多的希望,而表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)是经临床验证的多种类型肿瘤的治疗靶点,例如结直肠癌、非小细胞肺癌、头颈部鳞癌以及胰腺癌等^[11]。免疫组织化学检测显示,30%-45%的结直肠癌患者有EGFR的过表达^[12]。EGFR是ErbB受体家族成员,其配体(EGF、TGF- α 等)与EGFR胞外段结合使之二聚化,由此导致胞内段酪氨酸激酶活化以及一系列信号转导的级联反应,促进细胞增殖,血管生成,转移并抑制细胞凋亡^[13],从而导致肿瘤的发生。靶向药物与EGFR结合可抑制EGFR的活性及其介导的信号传导途径,进而减少肿

瘤细胞增殖扩散,而且还可抑制肿瘤细胞对化疗和放疗损害的自我修复能力以及肿瘤新生血管的生成,从而产生对肿瘤生长的整体抑制效应。K-ras蛋白是EGFR信号通路下游区的一种小分子G蛋白,是该信号通路的一个重要组成部分^[14]。在信号转导过程中,K-ras蛋白在GEFs的催化下磷酸化,进入活化状态,从而进行信号转导^[15]。而K-ras蛋白内在的GTP酶活性又能使GTP去磷酸化为GDP,使其回复到静息状态^[16],GAPs催化这个过程^[17]。*k-ras*基因发生突变后,抑制了自身的GTP酶活性,使其不易被GAPs激活,使得K-ras蛋白总是处于活化状态^[18],最终导致信号转导通路异常活化,不受EGFR上游信号指令的影响。这种状态下如果使用靶向药物EGFR单抗,EGFR单抗虽能与细胞膜表面EGFR结合,阻滞了信号通路的下传,但*k-ras*基因突变后可发生自身磷酸化,抗拒EGFR单抗的作用,从而对EGFR单抗治疗无效。由此可见,靶向药物治疗并非对所有EGFR过表达的结直肠癌患者都有效,事实上,相当一部分患者不能从靶向治疗中获益^[11,19,20]。

3 *k-ras*基因突变与结直肠癌靶向治疗

有研究表明,结直肠癌患者中*k-ras*基因的突变率约为35-40%^[21,22],而且90%的突变发生在12、13位密码子^[23]。其中约70%发生于第12位密码子,30%发生于13位密码子^[24],极少部分发生于第61、63位密码子^[10]。较常见的突变类型为G>A,其次是G>T和G>C^[25,26]。发生在12、13位密码子的突变提示预后不良^[27]。此外,发生在12位密码子上的突变被认为会降低患者的无进展生存期和总体生存期^[21]。最新的一项报道了95例结直肠癌患者*k-ras*基因突变检测情况,41例患者检出突变,其中33例发生在12、13、15、18位密码子,被归类为激活型*k-ras*突变^[28]。8例发生于20、30、31位密码子,被归类为非激活型*k-ras*突变,其中5例西妥昔单抗治疗有效。学者认为,激活型*k-ras*突变可以作为预测西妥昔单抗疗效的有效指标,对于非激活型*k-ras*突变的患者,EGFR可以作为无进展生存期和总体生存期的预测指标,EGFR表达上调的*k-ras*野生型及非激活型*k-ras*突变的患者,其无进展生存期和总体生存期明显优于激活型*k-ras*突变患者或EGFR阴性的患者^[29]。许多研究表明,*k-ras*基因突变发生在结直肠癌发生的早期阶段^[30],多项研究显示,原发灶和转移灶的*k-ras*基因保持高度一致^[31-33],提示在转移过程中*k-ras*基因突

■ 研发前沿

对结直肠癌的分子生物学及分子靶向治疗的研究已成为目前肿瘤治疗及预后判断的热点之一。越来越多的学者将目光投向了*k-ras*基因检测与结直肠癌关系方面并取得了一定进展。

■相关报道

结直肠癌组织中存在一定比例的 *k-ras* 基因突变。最新报道应用微流控温度梯度毛细管电泳法(Chip-based TGCE)能够检测最少2.51%的突变型 *k-ras* 基因, 是一种较为简便、灵敏的检测方法。

变维持稳定。一般认为, *k-ras* 基因状态也不会因治疗而发生变化。

有研究显示, *k-ras* 基因突变使结肠癌患者对放疗的敏感性下降, 而通过抑制结肠癌细胞 *k-ras* 基因突变表达可提高放疗的敏感性^[10]。体外研究显示存在 *k-ras* 基因突变的结肠癌细胞对5-FU的敏感性结论不一, 临床研究结果也各异^[10]。美国东部肿瘤协助组的EST2292试验显示, *k-ras* 基因突变与结直肠癌患者接受5-FU及干扰素治疗是否获益无相关性^[34]。美国西南肿瘤协作组的一项研究显示, 在III期的结肠癌患者中, *k-ras* 基因为野生型患者可以从5-FU联合左旋咪唑化疗中获益, 而 *k-ras* 基因突变者则否^[35]。有学者分析了 *k-ras* 基因突变的类型与化疗敏感相关性, 结果显示, *k-ras* 基因第12、13位密码子为非天冬氨酸突变患者较天冬氨酸突变患者可以从5-FU为基础的化疗中获得更长生存期^[36]。而Markowitz等^[37]研究认为 *k-ras* 基因状态与化疗敏感性无关。

2004-02, FDA批准了西妥昔单抗用于晚期转移性结直肠癌患者的治疗。西妥昔单抗是第一个被批准用于此类适应证的单克隆抗体, 经过了多个国际大规模II期和III期临床研究^[38]。三线治疗的临床研究有: NCIC CO.17^[20], BOND^[12]; 二线治疗的临床研究有: EPIC^[39], BOND^[12]; 一线治疗的临床研究有: CRYSTAL^[40], OPUS^[41]。目前西妥昔单抗已从晚期转移性结直肠癌患者三线治疗药物跃升成为一线治疗药物。随着研究的深入, 逐渐发现 *k-ras* 基因突变状态可能与西妥昔单抗疗效有关。如果 *k-ras* 基因12和13位密码子发生突变, 则西妥昔单抗治疗无效。因此, 运用EGFR靶向药物治疗之前必须进行靶向治疗疗效预测指标检测。到目前为止, 多项临床研究均认为 *k-ras* 基因突变可作为靶向治疗的疗效预测指标^[29,42]。

对于 *k-ras* 基因为野生型患者, 《美国国立综合癌症网络(NCCN)结直肠癌临床实践指南》推荐在FOLFOX、CapeOX或FOLFIRI方案基础上联合西妥昔单抗作为一线治疗。对一般状况差、不能接受化疗的患者, 也可考虑单药西妥昔单抗治疗^[43]。值得注意的是, 西妥昔单抗等靶向治疗也存在一些缺点, 除了费用昂贵外, 使用后有一些潜在的不良反应, 特别是皮肤毒性反应等。

4 *k-ras* 基因检测

4.1 *k-ras* 基因检测的意义 2008-10, *k-ras* 基因检

测被写入最新版《NCCN结直肠癌临床实践指南》。新指南传递给广大医师和患者两条重要信息: 一是所有转移性结直肠癌患者都应检测 *k-ras* 基因状态; 二是只有 *k-ras* 野生型患者才建议接受EGFR抑制剂如西妥昔单抗或帕尼单抗(包括单药或与化疗联合)治疗^[44]。

k-ras 基因突变检测对判断肿瘤的发生发展、预后以及了解肿瘤的治疗效果具有一定意义: (1)正常人血中检出 *k-ras* 基因异常, 提示存在肿瘤易感性; (2)良性肿瘤患者若检出 *k-ras* 基因突变, 提示有恶变的可能; (3)大量研究表明, *k-ras* 基因突变阳性, 即使病理组织学上淋巴结转移阴性, 癌症复发的可能性也很高; (4) *k-ras* 基因为野生型的结直肠癌患者, 经抗EGFR靶向药物治疗疗效明显。因此, 通过检测 *k-ras* 基因突变状态可以筛选用药人群, 实现肿瘤患者的个体化治疗, 延长患者生存期。

4.2 *k-ras* 基因检测方法学 *k-ras* 基因突变检测最好在肿瘤组织中进行, 需要提供石蜡包埋组织块或已切好的蜡屑或几张挂胶白片或新鲜的手术、活检标本, 外周血多不能反映真实情况。结直肠癌原发灶及转移灶 *k-ras* 基因状态基本相同, 所以可以选择原发灶也可以选择转移灶的标本进行测定^[45]。

ASCO/CAP^[46]对于结直肠癌 *k-ras* 基因突变的检测提出了意见, 建议检测前所有的标本需经有经验的病理医师筛选, 确认有足够的肿瘤细胞, 并且没有坏死及尽可能少的炎性细胞浸润。可视情采用显微切割的方法提取DNA。

k-ras 基因检测的方法很多, 如直接测序法、实时荧光定量PCR、聚合酶链反应-单链构象多态性分析、聚合酶链反应-限制性片段长度多态性方法(PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)、等位基因特异性扩增法(allele specific amplification, ASA)、高分辨率熔解曲线分析法(high resolution melting curve analysis, HRM)、焦磷酸测序方法、变性高效液相色谱法等, 每种方法各有优缺点。

直接测序法是检测基因突变的经典方法, 能检测 *k-ras* 基因第2、3外显子所有可能发生突变的位点, 但与其他检测方法相比, 灵敏度较低^[47], 突变的 *k-ras* 基因占总 *k-ras* 基因比例需达到20%-25%^[48], 此外, 还有成本高, 操作步骤多、易交叉污染等缺点。

HRM是最新兴起的低成本和操作简便的高通量突变扫描和基因分型技术。该技术在PCR

表 1 *k-ras*基因突变检测方法灵敏度比较^[53]

方法	灵敏度(%)
直接测序法	25
实时荧光定量PCR	3
PCR-RELP	5
焦磷酸测序	5
ASA	10
HRM	5
蝎形探针扩增阻滞突变系统	1

灵敏度: 能检出突变时, 突变*k-ras*基因占总*k-ras*基因所需的最低比例。

结束后直接运行高分辨率熔解, 通过饱和染料监控核酸的熔解过程, 得到特征的熔解曲线, 再根据熔解曲线的变化来判断核酸性质的差异^[49], 这种检测办法不受突变碱基位点与类型的限制, 灵敏度高达5%^[50], 需设计探针, 成本低, 操作简单, 较传统的突变分析法和定量探针法, 缩短了操作时间, 简化了操作步骤, 大大降低了使用成本, 并且实现了真正的闭管操作, 最大限度地避免了交叉污染, 在临床基因扩增实验室尤为重要。基于这些优势, HRM分析法未来可能会替代直接测序法成为一种常用的实验室检测手段^[50]。

实时荧光定量PCR以其特异性强、灵敏度高、重复性好、定量准确、速度快、全封闭反应等优点已成为分子生物学研究中的重要工具。常用于检测最常见的*k-ras*第12、13位密码子的突变。但目前荧光探针价格较昂贵, 且一对探针只能对应检测一种突变类型, 通用性不强, 导致使用成本较高。有文献报道, 将荧光定量PCR与ASA相结合, 即采用实时荧光ASA法对*k-ras*基因进行点突变分析, 可以检测出样品中含量极低的点突变, 其进一步发展有可能用于直接从粪便样品中检测结肠上皮组织所脱落的微量癌细胞, 从而实现结肠癌的早期无损伤检测。此外, 该方法快速、简便、灵敏、安全、高通量、低成本, 可望用于对大量临床样本进行点突变筛查^[51]。

英国DxS公司还生产了一种基于荧光实时定量PCR的*k-ras*检测方法(蝎形探针扩增阻滞突变系统(amplification refractory mutation system, ARMS)), 该方法具有较高的特异性和敏感性, 灵敏度高达1%^[52], 在欧洲已被广泛应用于临床检测。ASCO/CAP^[46]亦主要推荐该方法检测*k-ras*基因突变。几种常用的*k-ras*基因突变检测方法

灵敏度的比较见表1。

4.3 免疫组织化学法检测K-ras蛋白 采用免疫组织化学法亦可检测结直肠病变组织中的K-ras蛋白的表达, K-ras阳性产物定位于胞质中。有研究发现, 其表达率在结直肠癌、结直肠腺瘤及正常黏膜组织中分别为51.2%、33.3%和0.0%^[54]。该研究结果提示K-ras蛋白在结直肠癌和结直肠腺瘤中的表达均显著高于正常组织, 但在结直肠癌和结直肠腺瘤之间无明显差异。因此可以认为, 如果从结直肠病变组织中检测到K-ras蛋白则有利于临床的早期诊断。多项研究表明, K-ras蛋白在结直肠癌组织中的高表达与组织类型、浸润深度、Dukes分期、淋巴结转移及远处转移均无相关性^[55,56]。至于K-ras蛋白的检测在结直肠癌预后研究中的意义, 各报道结论仍有争议^[57-59]。这可能与所用抗体克隆不同、检测分析及组织处理方法不同、随访时间不同及随访对象出现选择性偏倚等因素有关。因此K-ras蛋白的检测对结直肠癌患者预后判断仍有待研究。

5 结论

*k-ras*基因突变是结直肠癌发生、发展及预后的不良因素, 同时与靶向治疗疗效密切相关。在结直肠癌患者内科治疗前应常规检测*k-ras*基因状态。在*k-ras*基因检测的整个过程中, 包括肿瘤检测标本的选择, 标本固定及取材规范, 建立规范的实验操作程序和标准化的分子诊断实验室, 统一判读标准以及对检测结果进行正确分析, 病理学家将发挥十分重要的作用^[60]。

6 参考文献

- 1 李学鹏, 周军. 了解大肠癌治疗新进展, 改变大肠癌治疗观念. 中国全科医学 2009; 12: 48-49
- 2 方桦, 王兴元, 王金万, 张弘纲, 冯奉仪, 石远凯. 300例结直肠癌肝转移患者的临床预后分析. 中华肿瘤杂志 2009; 31: 220-222
- 3 刘云鹏. 2008年转移性结直肠癌个体化治疗进展回顾. 中国癌症杂志 2009; 19: 406-408
- 4 Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin 2010; 60: 277-300
- 5 曹文兰, 布洁, 白月奎, 周良玉, 张文政, 武东风, 卫亚希. IV期结直肠癌非手术治疗临床研究. 肿瘤研究与临床 2003; 15: 412-413
- 6 Bivona TG, Quatela SE, Bodemann BO, Ahearn IM, Soskis MJ, Mor A, Miura J, Wiener HH, Wright L, Saba SG, Yim D, Fein A, Pérez de Castro I, Li C, Thompson CB, Cox AD, Philips MR. PKC regulates a farnesyl-electrostatic switch on K-Ras that promotes its association with Bcl-XL on mitochondria and induces apoptosis. Mol Cell 2006; 21: 481-493
- 7 Margaret P. Quinlan, Jeffrey Settleman. 癌症启动中Kras的特异性功能. 癌症 2008; 27: 673-674
- 8 沈琳. 转移性结直肠癌靶向治疗个体化选择. 肿瘤研

■创新盘点

本文全面综述了结直肠癌组织中*k-ras*基因或蛋白的表达状况, 检测方法学及其应用, 结直肠癌靶向治疗等最新进展, 使读者对结直肠癌*k-ras*基因研究现状有全面的认识。

■应用要点

- 结直肠癌患者中存在一定比例的 *k-ras* 基因突变, 在应用抗 EGFR 单抗类药物进行靶向治疗前, 均应常规检测 *k-ras* 基因状态。
- 9 究与临床 2008; 20: 507-508, 512
 - 10 单宝珍, 刘丽娜. K-ras 基因与结直肠癌关系研究进展. 医学与哲学(临床决策论坛版) 2010; 31: 42-44
 - 11 丁叔波, 朱远. Kras 基因与结直肠癌. 浙江临床医学 2009; 11: 1233-1235
 - 12 Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment. *N Engl J Med* 2008; 358: 1160-1174
 - 13 Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A, Bets D, Mueser M, Harstrick A, Verslype C, Chau I, Van Cutsem E. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 337-345
 - 14 梁后杰, 邹岚. EGFR 靶向药物治疗晚期结直肠癌最新进展. 中国处方药 2009; 84: 58-61
 - 15 Fukuyama T, Ogita H, Takai Y. [Small G proteins--their roles and functions on cell-cell junction]. *Nippon Ronen Igakkai Zasshi* 2005; 42: 9-14
 - 16 Buday L, Downward J. Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* 1993; 73: 611-620
 - 17 Brink M, de Goeij AF, Weijenberg MP, Roemen GM, Lentjes MH, Pachen MM, Smits KM, de Bruïne AP, Goldbohm RA, van den Brandt PA. K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Carcinogenesis* 2003; 24: 703-710
 - 18 Däbritz J, Hänfler J, Preston R, Stieler J, Oettle H. Detection of Ki-ras mutations in tissue and plasma samples of patients with pancreatic cancer using PNA-mediated PCR clamping and hybridisation probes. *Br J Cancer* 2005; 92: 405-412
 - 19 Schubert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 295-308
 - 20 Van Cutsem E, Peeters M, Siena S, Humblet Y, Hendlisz A, Neyns B, Canon JL, Van Laethem JL, Maurel J, Richardson G, Wolf M, Amado RG. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25: 1658-1664
 - 21 Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Karapetis CS, Zalcberg JR, Tu D, Au HJ, Berry SR, Krahn M, Price T, Simes RJ, Tebbutt NC, van Hazel G, Wierzbicki R, Langer C, Moore MJ. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2007; 357: 2040-2048
 - 22 Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ, Young J, Walsh T, Ward R, Hawkins N, Beranek M, Jandik P, Benamouzig R, Jullian E, Laurent-Puig P, Olschwang S, Muller O, Hoffmann I, Rabes HM, Zietz C, Troungos C, Valavanis C, Yuen ST, Ho JW, Croke CT, O'Donoghue DP, Giaretti W, Rapallo A, Russo A, Bazan V, Tanaka M, Omura K, Azuma T, Ohkusa T, Fujimori T, Ono Y, Pauly M, Faber C, Glaesener R, de Goeij AF, Arends JW, Andersen SN, Lövig T, Breivik J, Gaudernack G, Clausen OP, De Angelis PD, Meling GI, Rognum TO, Smith R, Goh HS, Font A, Rosell R, Sun XF, Zhang H, Benhattar J, Losi L, Lee JQ, Wang ST, Clarke PA, Bell S, Quirke P, Bubbs VJ, Piris J, Cruickshank NR, Morton D, Fox JC, Al-Mulla F, Lees N, Hall CN, Snary D, Wilkinson K, Dillon D, Costa J, Pricolo VE, Finkelstein SD, Thebo JS, Senagore AJ, Halter SA, Wadler S, Malik S, Krtolica K, Urošević N. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer* 2001; 85: 692-696
 - 23 Benvenuti S, Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Zanon C, Moroni M, Veronese S, Siena S, Bardelli A. Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res* 2007; 67: 2643-2648
 - 24 陈慧娟, 李洪波, 李硕敏, 鲁碧稳, 程俊峰, 刘元力. K-ras 基因突变与结直肠癌的关系. 肿瘤研究与临床 2010; 22: 461-463
 - 25 Frattini M, Saletti P, Romagnani E, Martin V, Molinari F, Ghisletta M, Camponovo A, Etienne LL, Cavalli F, Mazzucchelli L. PTEN loss of expression predicts cetuximab efficacy in metastatic colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 2007; 97: 1139-1145
 - 26 Sameer AS, Chowdhri NA, Abdullah S, Shah ZA, Siddiqi MA. Mutation pattern of K-ras gene in colorectal cancer patients of Kashmir: a report. *Indian J Cancer* 2009; 46: 219-225
 - 27 Brink M, Weijenberg MP, de Goeij AF, Roemen GM, Lentjes MH, de Bruïne AP, Goldbohm RA, van den Brandt PA. Meat consumption and K-ras mutations in sporadic colon and rectal cancer in The Netherlands Cohort Study. *Br J Cancer* 2005; 92: 1310-1320
 - 28 Esteller M, González S, Risques RA, Marcuello E, Mangues R, Germà JR, Herman JG, Capellà G, Peinado MA. K-ras and p16 aberrations confer poor prognosis in human colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2001; 19: 299-304
 - 29 Wang JY, Hsieh JS, Chen FM, Yeh CS, Alexandersen K, Huang TJ, Chen D, Lin SR. High frequency of activated K-ras codon 15 mutant in colorectal carcinomas from Taiwanese patients. *Int J Cancer* 2003; 107: 387-393
 - 30 Yen LC, Uen YH, Wu DC, Lu CY, Yu FJ, Wu IC, Lin SR, Wang JY. Activating KRAS mutations and overexpression of epidermal growth factor receptor as independent predictors in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *Ann Surg* 2010; 251: 254-260
 - 31 Lièvre A, Bachet JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, Ychou M, Bouché O, Landi B, Louvet C, André T, Bibeau F, Diebold MD, Rougier P, Ducreux M, Tomasic G, Emile JF, Penault-Llorca F, Laurent-Puig P. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2008; 26: 374-379
 - 32 Etienne-Grimaldi MC, Formento JL, Francoual M, François E, Formento P, Renée N, Laurent-Puig P, Chazal M, Benchimol D, Delpero JR, Letoublon C, Pezet D, Seitz JF, Milano G. K-Ras mutations and treatment outcome in colorectal cancer patients receiving exclusive fluoropyrimidine therapy. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 4830-4835
 - 33 Artale S, Sartore-Bianchi A, Veronese SM, Gambi V, Sarnataro CS, Gambacorta M, Lauricella C, Siena S. Mutations of KRAS and BRAF in primary and matched metastatic sites of colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 4217-4219
 - 34 Santini D, Loupakis F, Vincenzi B, Floriani I, Stasi I, Canestrari E, Rulli E, Maltese PE, Andreoni F, Masi G, Graziano F, Baldi GG, Salvatore L, Russo A, Perrone G, Tommasino MR, Magnani M, Falcone A, Tonini G, Ruzzo A. High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related

- metastatic sites: implications for clinical practice. *Oncologist* 2008; 13: 1270-1275
- 34 Wadler S, Bajaj R, Neuberg D, Agarwal V, Haynes H, Benson AB 3rd. Prognostic implications of c-Ki-ras2 mutations in patients with advanced colorectal cancer treated with 5-fluorouracil and interferon: a study of the eastern cooperative oncology group (EST 2292). *Cancer J Sci Am* 1997; 3: 284-288
 - 35 Ahnen DJ, Feigl P, Quan G, Fenoglio-Preiser C, Lovato LC, Bunn PA Jr, Stemmerman G, Wells JD, Macdonald JS, Meyskens FL Jr. Ki-ras mutation and p53 overexpression predict the clinical behavior of colorectal cancer: a Southwest Oncology Group study. *Cancer Res* 1998; 58: 1149-1158
 - 36 Gnanasampanthan G, Elsaleh H, McCaul K, Iacopetta B. Ki-ras mutation type and the survival benefit from adjuvant chemotherapy in Dukes' C colorectal cancer. *J Pathol* 2001; 195: 543-548
 - 37 Markowitz S, Hines JD, Lutterbaugh J, Myeroff L, Mackay W, Gordon N, Rustum Y, Luna E, Kleinerman J. Mutant K-ras oncogenes in colon cancers Do not predict Patient's chemotherapy response or survival. *Clin Cancer Res* 1995; 1: 441-445
 - 38 白春梅, 黄凌. 西妥昔单抗治疗进展性结直肠癌的疗效与KRAS基因突变状态的关系. *循证医学* 2009; 9: 145-149
 - 39 Sobrero AF, Maurel J, Fehrenbacher L, Scheithauer W, Abubakr YA, Lutz MP, Vega-Villegas ME, Eng C, Steinhauer EU, Prausova J, Lenz HJ, Borg C, Middleton G, Kröning H, Luppi G, Kisker O, Zube A, Langer C, Kopit J, Burris HA 3rd. EPIC: phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2311-2319
 - 40 Peeters M, Price TJ, Cervantes A, Sobrero AF, Duceux M, Hotko Y, André T, Chan E, Lordick F, Punt CJ, Strickland AH, Wilson G, Ciuleanu TE, Roman L, Van Cutsem E, Tzekova V, Collins S, Oliner KS, Rong A, Gansert J. Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 4706-4713
 - 41 Van Cutsem E, Labianca R, Bodoky G, Barone C, Aranda E, Nordlinger B, Topham C, Tabernero J, André T, Sobrero AF, Mini E, Greil R, Di Costanzo F, Collette L, Cisar L, Zhang X, Khayat D, Bokemeyer C, Roth AD, Cunningham D. Randomized phase III trial comparing biweekly infusional fluorouracil/leucovorin alone or with irinotecan in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: PETACC-3. *J Clin Oncol* 2009; 27: 3117-3125
 - 42 De Roock W, Piessevaux H, De Schutter J, Janssens M, De Hertogh G, Personeni N, Biesmans B, Van Laethem JL, Peeters M, Humblet Y, Van Cutsem E, Tejpar S. KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *Ann Oncol* 2008; 19: 508-515
 - 43 杨林. 大肠癌诊治指南解读(晚期结、直肠癌治疗部分). *中国全科医学* 2009; 11: 8-9
 - 44 Amado RG, Wolf M, Peeters M, Van Cutsem E, Siena S, Freeman DJ, Juan T, Sikorski R, Suggs S, Radinsky R, Patterson SD, Chang DD. Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008; 26: 1626-1634
 - 45 毕媛. K-RAS基因突变检测与大肠癌治疗的研究进展. *实用癌症杂志* 2010; 25: 435-437
 - 46 Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, Hamilton SR, Hammond EH, Hayes DF, McAllister PK, Morton RF, Schilsky RL. 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: 2091-2096
 - 47 Patil DT, Fraser CR, Plesec TP. KRAS testing and its importance in colorectal cancer. *Curr Oncol Rep* 2010; 12: 160-167
 - 48 Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, Yan L, Cantor M, Namgyal C, Mino-Kenudson M, Lauwers GY, Loda M, Fuchs CS. Sensitive sequencing method for KRAS mutation detection by Pyrosequencing. *J Mol Diagn* 2005; 7: 413-421
 - 49 黄好, 黄国庆. 高分辨率熔解-SNP及突变研究的最新工具. *生命的化学* 2007; 27: 573-576
 - 50 傅新晖, 邓艳红, 范新娟, 骆衍新, 陈典克, 王磊, 兰平, 刘焕亮, 汪建平. 利用高分辨率熔解曲线分析法检测结直肠癌中KRAS基因突变. *中华普通外科学文献(电子版)* 2009; 3: 14-16
 - 51 朱德斌, 邢达, 李贤, 张岚. 实时荧光等位基因特异性扩增法快速检测K-ras癌基因点突变. *高等学校化学学报* 2007; 28: 1031-1034
 - 52 Bando H, Tsuchihara K, Yoshino T, Kojima M, Ogasawara N, Fukushima H, Ochiai A, Ohtsu A, Esumi H. Biased Discordance of KRAS Mutation Detection in Archived Colorectal Cancer Specimens Between the ARMS-Scorpion Method and Direct Sequencing. *Jpn J Clin Oncol* 2010 Nov 26. [Epub ahead of print]
 - 53 Chang YS, Yeh KT, Chang TJ, Chai C, Lu HC, Hsu NC, Chang JG. Fast simultaneous detection of K-RAS mutations in colorectal cancer. *BMC Cancer* 2009; 9: 179
 - 54 李陈捷, 羊志辉, 陈森林, 周世权, 莫晔, 施小六. HER-2与K-RAS在结直肠癌中的表达及意义. *解放军医学杂志* 2007; 32: 598-600
 - 55 朱桂宝, 姚璇, 鲁翠荣, 聂绍发. 大肠癌组织P21蛋白的表达研究. *华中科技大学学报(医学版)* 2002; 31: 505
 - 56 González-Aguilera JJ, Oliart S, Azcoita MM, Fernández-Peralta AM. Simultaneous mutations in K-ras and TP53 are indicative of poor prognosis in sporadic colorectal cancer. *Am J Clin Oncol* 2004; 27: 39-45
 - 57 Pan ZZ, Wan DS, Chen G, Li LR, Lu ZH, Huang BJ. Co-mutation of p53, K-ras genes and accumulation of p53 protein and its correlation to clinicopathological features in rectal cancer. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 3688-3690
 - 58 Pajkos G, Kiss I, Sándor J, Ember I, Kisházi P. The prognostic value of the presence of mutations at the codons 12, 13, 61 of K-ras oncogene in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2000; 20: 1695-1701
 - 59 Hirvikoski P, Auvinen A, Servomaa K, Kiuru A, Rytömaa T, Makkonen K, Kosma VM. K-ras and p53 mutations and overexpressions as prognostic factors in female rectal carcinoma. *Anticancer Res* 1999; 19: 685-691
 - 60 梁智勇. 病理医师在消化道肿瘤靶向治疗中的作用. *中华病理学杂志* 2010; 39: 433-435

■同行评价

本文内容全面, 具有较好的可读性和科学性.