

# 左半与右半结肠癌 K-RAS 基因及肿瘤浸润 T 细胞表达的比较

许洪宝 张贵阳 郑照正 蔡炜龙 汪伟民 楼能

**【摘要】** **目的** 对左半与右半结肠癌 K-RAS 基因及肿瘤浸润 T 细胞(TIL)表达进行对比分析。 **方法** 收集 2017 年 1 月至 2019 年 1 月手术治疗的结直肠癌患者 315 例。采集患者的临床资料,包括性别、年龄、淋巴转移情况、肿瘤分化程度及病理分期。采用二代测序法检测 KRAS 基因突变情况,免疫组化染色检测肿瘤组织中 TIL(CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞)的表达情况,对左、右半结肠癌的临床特征及 K-RAS 基因突变、TIL 表达情况进行比较。 **结果** 左、右半结肠癌患者的性别、年龄、淋巴转移状态、肿瘤分化程度及病理分期的比较差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ );左半结肠癌 K-RAS 基因野生型的比例高于右半结肠癌,差异有统计学意义( $\chi^2=6.27$ ,  $P < 0.05$ );左半结肠癌中 TIL 的比例高于右半结肠癌,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );右半结肠癌患者肝转移和肺转移比例均高于左半结肠癌,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。 **结论** 左半与右半结肠癌 K-RAS 基因及肿瘤浸润 T 细胞的表达存在差异。

**【关键词】** 结直肠癌 K-RAS 基因 肿瘤浸润 T 细胞

Expression of k-ras wild-type and tumor infiltrating T cells in left and right colorectal cancer XU Hongbao, ZHANG Guiyang, ZHENG Zhaozheng, et al. Department of Surgery, Huzhou Central Hospital, Huzhou 313000, China

**【Abstract】** **Objective** To compare the expression of K-RAS gene and tumor infiltrating T cells (TILs) in left and right colon cancer. **Methods** A total of 315 patients with colorectal cancer treated surgically in Huzhou Central Hospital from January 2017 to January 2019 were recruited. Clinical and pathological information including gender, age, lymphatic metastatic states, degree of differentiation and pathological stages were collected. The immunohistochemical staining was performed on the expression status of CD3<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in colorectal cancer patients, and the next-generation gene sequencing was used to determine the mutation status of K-RAS gene. The expression of TILs and the mutation of K-RAS gene were compared between left and right colon cancer. SPSS software was used to analyze the relationship between the expression of TILs and K-RAS gene. **Results** There were no significant differences in gender, age, lymph node metastasis, differentiation degree or pathological stage between the left and right colorectal cancer patients ( $P > 0.05$ ). The proportion of wild-type K-RAS gene in left colorectal cancer was higher than that in right colorectal cancer ( $\chi^2=6.27$ ,  $P < 0.05$ ). The proportion of TILs in left colorectal cancer was higher than that in right colorectal cancer ( $P < 0.05$ ). The incidence of liver metastasis and lung metastasis in patients with right colon cancer was higher than that in patients with left colon cancer ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** There are differences in K-RAS gene and T cell expression in left and right colon cancer.

**【Key words】** Colorectal cancer K-RAS genes Tumor infiltrating T cells

结直肠癌(colorectal cancer)是世界上第 3 大常见的恶性肿瘤,也是导致癌症死亡的第 4 大原因<sup>[1]</sup>。K-RAS 基因是目前结直肠癌研究领域中最受关注的基因之一,它对调控肿瘤细胞生长起着枢纽作用。K-RAS 基因突变能够导致细胞生长失去调控,引起肿瘤细胞快速生长<sup>[2]</sup>。因此 K-RAS 基因是否有突变是影响肿瘤预后的一个重要指标。肿瘤浸润 T 细胞(tumor infiltrating lymphocytes,

TIL)是直接从肿瘤组织中分离出来的淋巴细胞,它们能够识别肿瘤抗原,直接诱导肿瘤细胞溶解,或释放特定的趋化和促炎细胞因子<sup>[3]</sup>。TIL 是否大量存在与结直肠癌患者的临床预后密切相关<sup>[4]</sup>。这两项指标与肿瘤的发生、发展和预后关系密切,近年已引起国内外学者的广泛关注。由于左半与右半结肠癌有不同的临床特征,其 K-RAS 基因和 TIL 表达情况如何,笔者作了进一步研究,现将结果报道如下。

## 1 对象和方法

1.1 对象 收集本院 2017 年 1 月至 2019 年 1 月手术

DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.12.2019-1363

作者单位:313000 湖州市中心医院外科

通信作者:张贵阳,E-mail:taihu7859099@163.com

治疗的结直肠癌患者 315 例。根据病变部位分为两组,其中左半结肠癌 175 例,右半结肠癌(包括直肠癌)140 例,两组患者在性别、年龄、淋巴转移状态、肿瘤分化程度、病理分期等方面的比较差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ ),见表 1。入选标准:(1)经病理检查确诊为结直肠癌;(2)未行

化疗、放疗等其他抗肿瘤治疗;(3)本人或其家属签署知情同意书。排除标准:(1)合并有其他恶性肿瘤;(2)合并有严重心肺疾病;(3)合并有克罗恩病、溃疡性结肠炎等其他肠道疾病。本研究经本院伦理委员会批准。

表 1 两组结肠癌患者一般资料比较[例(%)]

组别	n	性别		年龄		淋巴转移		分化程度			病理分期			
		男	女	<50 岁	≥50 岁	有	无	低	中	高	I	II	III	IV
左半结肠癌组	175	94(53.7)	81(46.3)	86(49.1)	89(50.9)	68(38.9)	107(61.1)	58(33.1)	62(35.4)	55(31.4)	14(8.0)	41(23.4)	42(24.0)	78(44.57)
右半结肠癌组	140	80(57.1)	60(42.9)	68(48.6)	72(51.4)	52(37.1)	88(62.9)	43(30.7)	45(32.1)	52(37.1)	7(5.0)	36(25.7)	38(27.1)	59(42.1)
$\chi^2/Z$ 值		0.37		0.01		0.1		1.14			1.62			
P 值		0.54		0.92		0.8		0.57			0.65			

## 1.2 方法

**1.2.1 K-RAS 基因突变情况检测** 采用二代测序技术,按照说明书步骤在组织标本中提取各组 DNA,应用高通量基因测序仪检测结直肠癌 K-RAS 基因突变状态,依次构建文库、基因测序和数据分析。具体步骤如下:根据测序需要,将提取的 DNA 构建文库;根据扩增片段,加用测序接头,进行文库的扩增。然后应用测量仪检测 DNA 浓度。根据样本的测序需求混合样本,继续检测取得的混合样本中 DNA 的浓度,稀释制备模板。在测序完成后进行拼接、过滤,舍弃低质量序列及杂合序列,获得用于分析的优质序列,最后在基因测序仪上进行测序。

**1.2.2 TIL(CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞)表达水平检测** (1)先通过固定、浸泡、脱蜡方式处理组织切片;(2)用 PBS 液冲洗 3 次以上,然后将切片置于加热后的柠檬酸缓冲液中;(3)约 15min 后取出切片,待冷却后再次用缓冲液冲洗;(4)切片加一抗处理,置于冰箱内以 4℃ 保存约 24h,取出后再次进行冲洗;(5)切片加二抗处理,室温下孵育约 10min,再用缓冲液冲洗;(6)PBS 液洗膜,DAB 显色处理,显微镜观察染色结果。染色强度计分:无色为 0 分,浅黄色为 1 分,黄色为 2 分,深黄色为 3 分。阳性细胞百分比计分:≤5% 为 0 分,5%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分,51%~75% 为 3 分,>75% 为 4 分。最终的结果为染色强度与阳性细胞百分比计分的乘积:<3 分为阴性(-),3~4 分为弱阳性(+),4~5 分为中等阳性(++),>6 分为强阳性(+++)。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 22.0 统计软件。计数资料组间比较采用  $\chi^2$  检验,等级资料组间比较采用非参数秩和检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 两组 K-RAS 基因突变情况比较** 对左半结肠癌与

右半结肠癌 K-RAS 基因突变情况检测结果进行分析,发现左半结肠癌 K-RAS 基因野生型比例高于右半结肠癌,差异有统计学意义( $\chi^2=6.27, P < 0.05$ ),见表 2。

表 2 两组 K-RAS 基因突变情况的比较[例(%)]

组别	n	K-RAS 基因野生型	K-RAS 基因突变型
左半结肠癌组	175	106(60.6)	69(39.4)
右半结肠癌组	140	65(46.4)	75(53.6)

**2.2 两组 TIL 表达情况的比较** 免疫组化染色法检测 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞阴性及阳性表达情况见图 1。对左、右半结肠癌 TIL 表达情况进行分析,发现左半结肠癌 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 比例均高于右半结肠癌,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ ),见表 3。

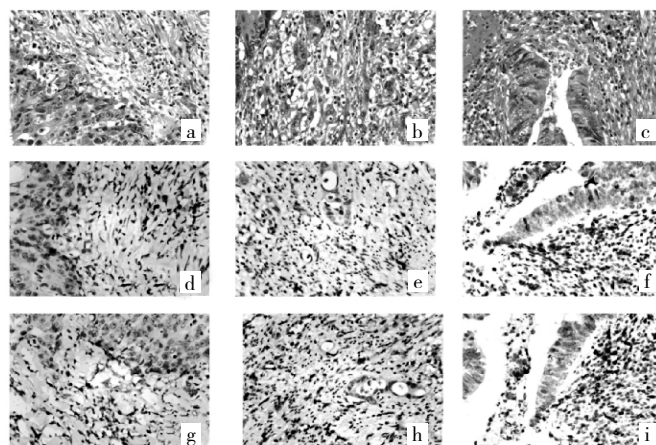


图 1 免疫组化染色结果[a~c: 阴性对照;d~i: 阳性对照;d: CD3(+);e: CD3(++);f: CD3(+++);g: CD4(+);h: CD4(++);i: CD4(+++);免疫组化染色,×400]

**2.3 两组肝、肺转移发生率的比较** 对左半结肠癌与右半结肠癌肝、肺转移发生率进行比较,发现右半结肠癌肝、肺转移比例均高于左半结肠癌,差异均有统计学意义(均  $P < 0.01$ ),见表 4。

表 3 两组 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 表达情况的比较例(%)

组别	n	CD3		CD4	
		-	+	-	+
左半结肠癌组	175	35(20.0)	140(80.0)	42(24.0)	133(76.0)
右半结肠癌组	140	72(51.4)	68(48.6)	69(49.3)	71(50.7)
χ <sup>2</sup> 值		34.25		21.79	
P 值		<0.01		<0.01	

表 4 两组肝转移发生率的比较例(%)

组别	n	肝转移		肺转移	
		有	无	有	无
左半结肠癌组	175	39(22.3)	136(77.7)	41(23.4)	134(76.6)
右半结肠癌组	140	62(44.3)	78(55.7)	68(48.6)	72(51.4)
χ <sup>2</sup> 值		17.28		22.69	
P 值		<0.01		<0.01	

### 3 讨论

结直肠癌早期诊断困难,许多患者就诊时已发生了远处转移,5年生存率低,是全球范围内发病率和病死率都极高的恶性肿瘤<sup>[5-7]</sup>。随着人们对结直肠癌信号通路与分子分型研究的深入,发现 K-RAS 通路对结直肠癌的发生、发展起重要作用<sup>[8]</sup>。国内外多项研究表明,K-RAS 基因野生型控制着细胞生长路径的调控,K-RAS 基因突变可能与结直肠癌病变部位有关,且通常右半结肠癌发病率高于左半结肠癌,但与其他临床病理特征无关<sup>[9-10]</sup>,本研究结果与此一致。K-RAS 作为 RAS 基因中的一员,突变频繁,检出率可达 40%,K-RAS 基因突变会直接影响抗肿瘤药物的疗效,从而影响肿瘤患者的预后<sup>[11]</sup>。

在结直肠癌中,免疫反应和 TIL 分析已被作为肿瘤分类的手段和预后的生物学标志物。结直肠癌患者肿瘤组织中存在 TIL,大多数研究表明,CD3<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、PTPRC<sup>+</sup>或 FOXP3<sup>+</sup> T 淋巴细胞密度越高,临床疗效越好(能表现出较强的免疫应答<sup>[12]</sup>)。在 Kwak 等<sup>[13]</sup>的研究中,证实肿瘤组织中 TIL 不仅存在数量上的差异,而且与肿瘤部位关系密切,本研究结果也与此一致,即 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞比例左半结肠癌高于右半结肠癌。CD4<sup>+</sup>作为辅助 T 淋巴细胞的主要表面标志物,是免疫肿瘤细胞死亡的主要介质,介导肿瘤细胞的表达,对肿瘤进展起保护作用<sup>[14]</sup>。在一些强调 CD4<sup>+</sup>细胞可能通过 Th1 机制介导抗肿瘤反应的研究中发现,在结直肠癌抗肿瘤免疫中 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞发挥不可或缺的作用。近年来多项研究表明,CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞不仅可以提高 CD8<sup>+</sup> T 淋巴细胞的疗效,而且还具有单独消除肿瘤细胞的作用。

左、右半结肠癌具有不同的生物学和临床特征,在 Salem 等<sup>[15]</sup>的研究中发现,与左半结肠癌相比,右半结肠

癌具有频繁的 EGFR 通路异常活动和突变风险。一项关于结肠癌生存周期的研究表明,右半结肠癌的预后比左半结肠癌差<sup>[16]</sup>。Baldus 等<sup>[17]</sup>研究表明,Kras 基因突变的结直肠癌患者,出现远处器官转移的发生率更高。Testa 等<sup>[18]</sup>研究证实,结直肠癌转移与 K-RAS 基因突变和 Tp53 基因突变相关。

探讨左、右半结肠癌 K-RAS 基因及 TIL 表达情况,可以为结直肠癌患者疗效监测和预后评估提供临床检测指标,同时充分考虑左、右半结肠癌临床表现特征,为患者提供个体化诊疗方案,减少不必要的医疗费用。本研究从 K-RAS 基因突变类型和 TIL 表达水平层面探讨了左、右半结肠癌的差异,由于存在样本量相对较小、未进行多中心研究的不足,其最终结论有待于进一步扩大样本量,从多个医院采集病例,进行多中心研究来加以验证。

### 4 参考文献

- [1] Han S, Gao J, Zhou Q, et al. Role of intestinal flora in colorectal cancer from the metabolite perspective: a systematic review[J]. *Cancer Management and Research*, 2018, 10:199-206. DOI: 10.2147/CMAR.S153482.
- [2] 冯滢滢, 丁建华, 赵克. 散发性结直肠癌的分子机制研究进展[J]. *实用肿瘤学杂志*, 2015, 29(5):471-475. DOI:10.11904/j.issn.1002-3070.2015.05.019.
- [3] Jakubowska K, Kisielewski W, Kańczuga-Koda L, et al. Stromal and intraepithelial tumor-infiltrating lymphocytes in colorectal carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(6):6421-6432. DOI:10.3892/ol.2017.7013.
- [4] Noshu K, Sukawa Y, Adachi Y, et al. Association of Fusobacterium nucleatum with immunity and molecular alterations in colorectal cancer[J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2016, 22(2):557-566. DOI:10.3748/wjg.v22.i2.557.
- [5] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018[J]. *Ca A Cancer Journal for Clinicians*, 2018, 60(5):277-300. DOI:10.3322/caac.21387.
- [6] Chen W, Zheng R, Zhang S, et al. Cancer incidence and mortality in China in 2013[J]. *Cancer Lett*, 2017, 401:63-71. DOI:10.1016/j.canlet.2017.04.024.
- [7] Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer[J]. *Lancet*, 2014, 383(9927):1490-1502. DOI:10.1016/S0140-6736(13)61649-9.
- [8] Dienstmann R, Vermeulen L, Guinney J, et al. Consensus molecular subtypes and the evolution of precision medicine in colorectal cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(2):79-92. DOI:10.1038/nrc.2016.126.
- [9] 彭建, 陈颖, 董先龙, 等. KRAS 基因突变与结直肠癌患者临床病理特征及预后的关系[J]. *中华消化外科杂志*, 2018, 17(2):143-147. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2018.02.005.
- [10] 代云, 郑国华, 李青. 结直肠癌患者 BRAF, KRAS, MMIS 和 PIK3CA 基因突变与其病理特征的关系[J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(5):

(下转第 1311 页)

综上所述, METTL3 mRNA 和蛋白在结直肠癌中高表达, 与结直肠癌的淋巴转移存在密切关系。故而, METTL3 可作为预测结肠癌分化水平和转移的重要指标, 为以后治疗及药物研发提供了重要依据。关于 METTL3 在结直肠癌的发生与发展中的调控作用及其分子机制有待进一步研究。

#### 4 参考文献

- [1] DeSantis CE, Lin CC, Mariotto AB, et al. Cancer treatment and survivorship statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(4):252-271. DOI: 10.3322/caac.21235.
- [2] Miller KD, Siegel RL, Lin CC, et al. Cancer treatment and survivorship statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(4):271-289. DOI: 10.3322/caac.21349.
- [3] Karin M, Lawrence T, Nizet V. Innate immunity gone awry: Linking microbial infections to chronic inflammation and cancer[J]. Cell, 2006, 124:823. DOI: 10.1016/j.cell.2006.02.016.
- [4] Meyer KD, Saletore Y, Zumbo P, et al. Comprehensive Analysis of mRNA Methylation Reveals Enrichment in 3' UTRs and near Stop Codons[J]. Cell, 2012, 149:1635. DOI: 10.1016/j.cell.2012.05.003.
- [5] Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Schwartz S, et al. Topology of the human and mouse m(6A) RNA methylomes revealed by m(6A)-seq[J]. Nature, 2012, 485:201. DOI: 10.1038/nature11112.
- [6] Wang X, Feng J, Xue Y, et al. Structural basis of N-6-adenosine methylation by the METTL3-METTL14 complex[J]. Nature, 2016, 534:575. DOI: 10.1038/nature18298.
- [7] Geula S, Moshitch-Moshkovitz S, Dominissini D, et al. m(6A) mRNA methylation facilitates resolution of naive pluripotency toward differentiation[J]. Science, 2015, 347:1002. DOI: 10.1126/science.1261417.
- [8] Liu J, Yue Y, Han D, et al. A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N-6-adenosine methylation[J]. Nature Chemical Biology, 2014, 10:93. DOI: 10.1038/nchembio.1432.
- [9] Ping XL, Sun BF, Wang L, et al. Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase [J]. Cell Research, 2014, 24:177. DOI: 10.1038/cr.2014.3.
- [10] Choe J, Lin S, Zhang W, et al. mRNA circularization by METTL3-eIF3h enhances translation and promotes oncogenesis [J]. Nature, 2018, 561(7724):556-560. DOI: 10.1038/s41586-018-0538-8.
- [11] Chen M, Wei L, Law CT, et al. RNA N6-methyladenosine methyltransferase-like 3 promotes liver cancer progression through YTHDF2-dependent posttranscriptional silencing of SOCS2[J]. Hepatology, 2018, 67(16):2254-2270. DOI: 10.1002/hep.29683.
- [12] Li X, Tang J, Huang W, et al. The M6A methyltransferase METTL3: acting as a tumor suppressor in renal cell carcinoma [J]. Oncotarget, 2017, 8:96-103. DOI: 10.18632/oncotarget.21726.
- [13] Cai X, Wang X, Cao C, et al. HBXIP-elevated methyltransferase METTL3 promotes the progression of breast cancer via inhibiting tumor suppressor let-7g[J]. Cancer Letters, 2018, 415: 11. DOI: 10.1016/j.canlet.2017.11.018.
- (收稿日期:2019-03-03)  
(本文编辑:沈昱平)
- (上接第 1307 页)  
875-880. DOI:10.3978/j.issn.2095-6959.2017.05.001.
- [11] Ugo T, Elvira P, Germana C. Colorectal Cancer: Genetic Abnormalities, Tumor Progression, Tumor Heterogeneity, Clonal Evolution and Tumor-Initiating Cells[J]. Medical Sciences, 2018, 6(2):31. DOI:10.3390/medsci6020031.
- [12] Hu X, Li XQ, Li QG, et al. Osteoglycin-induced VEGF Inhibition Enhances T Lymphocytes Infiltrating in Colorectal Cancer [J]. EBioMedicine, 2018, 34:35-45. DOI: 10.1016/j.ebiom.2018.07.021.
- [13] Kwak Y, Koh J, Kim DW, et al. Immunoscore encompassing CD3+ and CD8+ T cell densities in distant metastasis is a robust prognostic marker for advanced colorectal cancer[J]. Oncotarget, 2016, 7(49):81778-81790. DOI:10.18632/oncotarget.13207.
- [14] Braga WMT, Da Silva BR, De Carvalho AC, et al. FOXP3 and CTLA4 overexpression in multiple myeloma bone marrow as a sign of accumulation of CD4+ T regulatory cells[J]. Cancer Immunology, Immunotherapy, 2014, 63(11):1189-1197. DOI: 10.1007/s00262-014-1589-9.
- [15] Salem ME, Weinberg BA, Xiu J, et al. Comparative molecular analyses of left-sided colon, right-sided colon, and rectal cancers[J]. Oncotarget, 2017, 8(49):86356-86368. DOI:10.18632/oncotarget.21169.
- [16] Petrelli F, Tomasello G, Borgonovo K, et al. Prognostic Survival Associated With Left-Sided vs Right-Sided Colon Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis[J]. JAMA Oncol, 2017, 3(2):211-219. DOI: 10.1001/jamaoncol.2016.4227.
- [17] Kwon MJ, Kim JW, Jung JP, et al. Low incidence of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in adenocarcinomas of the ampulla of Vater and their prognostic value[J]. Human Pathology, 2016, 50:90-100. DOI:10.1016/j.humpath.2015.11.009.
- [18] Ugo T, Elvira P, Germana C. Colorectal Cancer: Genetic Abnormalities, Tumor Progression, Tumor Heterogeneity, Clonal Evolution and Tumor-Initiating Cells[J]. Medical Sciences, 2018, 6(2):31. DOI:10.3390/medsci6020031.
- (收稿日期:2019-05-07)  
(本文编辑:俞骏文)