

## 超声引导下细针穿刺在胰腺癌 ras 基因诊断中的应用

郑 敏,李春艳,成小松

(哈尔滨医科大学附属第一医院超声科,黑龙江 哈尔滨 150001)

[中图分类号] R445.1; R735.9 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2001)10-0921-02

胰腺癌是临床常见消化系统的恶性肿瘤之一,确诊较晚是其预后差的主要因素之一,尤其是对一些与炎症难以鉴别的胰腺癌,更缺乏有效的诊断方法。近年来随着医学技术的不断发展,国内外学者在胰腺癌早期诊断方法上进行了比较深入的研究,使得胰腺癌的诊断手段日益增多,特别是介入超声学的迅猛发展,使得胰腺癌的诊断方法更加丰富。同时,分子生物学的引入,尤其是高度敏感的 ras 基因的引入弥补了超声引导下细针穿刺活检法的不足使该方法更加完善。应用此方法,不仅可以对有症状的病人及早诊断,缩短确诊时间,尽早得到诊治,也为胰腺癌的鉴别诊断提供有效的手段。本文将对介入性超声在胰腺癌早期基因诊断中的应用进行再次探讨。

胰腺癌是发展迅速预后极差的恶性肿瘤,手术切除是唯一可以治疗的方法。但胰十二指肠切除手术创伤很大,死亡率很高,因此术前诊断需要明确而可靠。一般认为手术中对肿块取活检应当是比较有效的方法,然而在胰腺这恰恰是临床外科非常棘手的问题。由于胰腺癌的周围组织通常为炎症浸润区域,并且含有大量致密的纤维组织,癌块组织有可能小而深。手术中活检只能从胰腺的表面取材,有时达不到肿块的深度,因此假阴性率较高,达 15%~40%。如果活检取材深,虽然可以降低假阴性率,但容易发生出血,胰瘘,脓肿或急性胰腺炎等严重并发症。自从应用超声引导下细针穿刺活检(fine needle aspiration biopsy; FNAB)以来,这个问题得到了解决<sup>[7]</sup>。由于有超声引导,能够准确地穿刺到肿块组织,且一般选择较细的 20~21 号穿刺针,对组织损伤很小,可以对肿块不同的部位做多次精确取样,进而提高诊断的准确率。临床应用, FNAB 可分为两种:经皮细针细胞学活检和经皮细针组织学活检。对二者进行比较发现,细针组织学活检比细针细胞学活检对胰腺病变的诊断更有价值,它有以下优点:①能够确定胰腺癌的组织学类型及其分化程度;②能够显示癌细胞形成的腺管以及对神经周围和血管的浸润情况;③对于一些分化较好的腺癌、囊腺癌等细胞学较难诊断的疾病,组织学的诊断相对容易;④慢性胰腺炎的细胞学诊断只能提示“未见癌细胞”,而组织学则会结合背景等多方面因素作出更客观

的病理诊断;⑤在对大量增生的纤维组织中间仅稀疏分布少数癌细胞的病例进行 FNAB 时,细针吸取细胞学活检很难得到细胞成分,有可能出现假阴性结果而贻误治疗,组织学活检与之相比效果较好。

尽管 FNAB 已广泛应用于胰腺癌的临床诊断,但必须要有经验的临床病理医生的有效配合,才会取得可靠的结果。若穿刺吸取的标本量过少,涂片质量差或病理医生的经验不足等,都会出现假阴性<sup>[8]</sup>。鉴于单纯应用 FNAB 存在一定的弊端,而点突变的检测不受这些因素的影响,各国学者根据胰腺癌的临床特点以及通过基础研究证实胰腺癌具有较高的 K-ras 基因 12 密码子突变率,展开了超声引导下细针穿刺与基因检测相结合用于胰腺癌早期诊断的研究。

## 1 Ras 基因结构和功能及其与胰腺癌的关系

Ras 基因是常见的人类肿瘤基因,它由 K-ras, H-ras 和 N-ras 家族组成,编码蛋白 P21,所编码的蛋白质由 188~189 个氨基酸构成,分子量为 21KD。该蛋白位于细胞膜的内表面,类似于已知的 G 蛋白,与 GTP 和 GDP 结合,具有 GTP 酶活性,它可能作为“分子开关”,以膜结合受体的形式将信号传递到细胞靶位。通过人肿瘤细胞 DNA 转化实验已经证实激活的 ras 基因可以转化小鼠胚胎细胞而成为肿瘤细胞。如果激活的 ras 基因不能自行灭活, DNA 无限制地复制,则有利于肿瘤的形成。ras 基因激活有许多形式,包括表达增加,基因突变,内在的 GTP 酶活性降低,或与 GTP 和 GDP 结合的能力下降。其中最常见方式为点突变,即 DNA 的碱基变化,主要为第 12、13 和 61 密码子的突变。ras 基因存在于多种恶性肿瘤中,如肺癌,结直肠癌,甲状腺癌,胰腺癌和膀胱癌等。其中胰腺癌的 K-ras 基因突变率最高,且绝大多数突变在 12 密码子。

Almoguera 等最先于 1988 年报道了胰腺癌中 K-ras 的高突变率,他们采用了以聚合酶链式反应(PCR)为基础的 RNA 酶清除法对 22 例胰腺癌进行检测,发现 21 例(95%)存在 K-ras 12 密码子的突变<sup>[1]</sup>。Tada 等使用 PCR 和直接连锁反应法对 18 例手术中或尸检取得的胰腺和胰周肿瘤标本进行 ras 基因分析,18 例胰腺癌均有 K-ras 基因突变,突变率达 100%,突变的形式为 GGT→GAT, GTT 或 GCT<sup>[2]</sup>。近十年来,国内外学者不断进行着 ras 基因与胰腺癌关系的研究<sup>[3-5]</sup>,揭示了 ras 基因在胰腺癌中的特点:①见于 90% 以上胰腺癌,具有组织相对特异性;②由于突变多位于密码子 12,因此检测方法相对简单;③ K-ras 基因突变是胰腺癌发生过程中早期即有的一种表现。随肿瘤的发展其突变率增高,与肿瘤大小有明显的相关性,小肿瘤突变的发生率明显低于大

[基金项目] 本研究系黑龙江省“九五”攻关课题资助项目(G97C180301)。

[作者简介] 郑敏(1956—),女,山东人,硕士,副主任医师。研究方向:介入性超声在癌症早期基因诊断中的应用。

[收稿日期] 2001-03-20

肿瘤<sup>[9]</sup>;④胰腺癌细胞中 K-ras 基因突变的存在还与肿瘤发生部位有关,胰头癌的 K-ras 基因突变检出率为 96.4%,胰体、尾的检出率为 57.1%;⑤地理位置的差异会导致碱基突变方式有所不同,这可能与不同地区致病因子不同有关;⑥正常的胰腺组织及胰腺其它病变、胰外胆管和壶腹癌无 K-ras 基因突变或突变率极低<sup>[10]</sup>,即在少数慢性胰腺炎患者中也发现了 ras 基因突变<sup>[6]</sup>,提示慢性胰腺炎极有可能最终发展为胰腺癌。

## 2 胰腺癌基因诊断中 FNAB 的应用

Tada 等<sup>[2]</sup>对 19 例临床疑有胰腺癌患者进行术前超声经皮细针穿刺活组织检查及 K-ras 基因突变的检测,其结果如下:临床诊断或高度怀疑为胰腺癌共 13 例,其中细针抽吸组织病理诊断证实为胰腺癌 9 例,全部发现 K-ras 基因突变;其余 4 例针吸组织过少,病理形态学难以作出确定诊断,但其中 3 例发现 K-ras 突变,另 1 例未发现 K-ras 突变者经手术确诊为嗜铬细胞瘤。上述基因诊断方式可在 2 天之内完成,而且是在超声引导下进行,安全系数高,手术前可得到有用的信息。

Urban 等<sup>[11]</sup>对 20 例胰腺疾病患者进行了超声经皮细针穿刺细胞检查及 ras 基因突变检测,发现 11/12 例胰腺癌获得阳性结果,其中 2 例细胞学检查为阴性,8 例其它疾病全为阴性。他们认为 ras 基因诊断和 FNAB 细胞形态学诊断是互相补充的。尤其是当抽吸组织过少时,在显微镜下炎症的非典型性细胞常难于和分化较好的恶性细胞区别,此时,基因诊断却不受限制。Villanueva 等<sup>[12]</sup>也进行了相同的研究,结论与 Urban 一致。

国内王志永等<sup>[13]</sup>及作者<sup>[14]</sup>应用超声引导技术对 38 例和 25 例可疑胰腺癌及其邻近器官占位病变患者进行穿刺活检,同时采用聚合酶链反应-限制性酶切片断长度多态性分析技术(PCR-RFLP),对所取得的标本 K-ras 基因第 12 密码子突变进行检测。结果发现 22 例胰腺癌中 21 例,15 例中 14 例存在 K-ras 基因突变,阳性率分别为 93.3%和 95.4%,而其他慢性胰腺炎、壶腹癌、胰岛素瘤等均无突变。本作者认为随着 PCR 技术的改进,应用 FNAB 做细胞学检查后残留的极少量标本,可以获得很好的扩增效果和明确的阳性检出,再与细针穿刺细胞学检查相结合,可提高胰腺癌确诊率,从而为可切除病变争取了时机,对不能切除的病变,由于直接获得了病理依据,可及时开始其它治疗。特别是对于难以鉴别的胰腺炎症和肿瘤,基因突变检测可作为鉴别诊断的可靠的分子生物学指标。结果阳性者,立即手术探查和开始其它治疗;结果阴性者,可暂时不手术,密切随诊观察。

用于基因诊断的点突变检测方法很多,包括 PCR-SSCP, PCR-RFLP, PCR-sequence, PCRdot blot 等。每种方法都各自存在优缺点:PCR-SSCP 能在较短的时间内完成,但其敏感性低,不能准确定位且不能判定有意义或无意义突变;PCR-RFLP 虽然是一种简便、快速、敏感的方法,但其最大的缺点是不能证实碱基突变类型;PCR-sequence 可以对 PCR 产物直接测定碱基序列,准确检测突变类型,但技术难度较大;其它技术则存在所需时间长,操作繁琐,设备要求高等缺点。为了克服以上技术的不足,王志永<sup>[13]</sup>等采用了两轮法 PCR-RFLP 进行检测,在第一轮 PCR-酶切后,使非瘤细胞中未发

生突变的野生型基因扩增产物多数被酶切下来而不能在第二轮 PCR 时作为模板进行扩增,进而使发生突变的基因产物在第二轮 PCR 中可以作为模板进行有效的扩增。改良后的 PCR-RFLP 法所检出的突变都为有意义突变,即突变后的基因表达产物蛋白质中必然发生了氨基酸的替换,最终引起蛋白质功能的异常。

## 3 结语

超声引导下细针穿刺基因诊断胰腺癌为胰腺癌的早期诊断提供了一条新的思路,为介入超声医学的发展开拓广阔的前景,使分子生物学技术在新的领域中得以应用,是二者有益的结合,是医学分支互相结合为临床服务的良好典范。

## [参考文献]

- [1] Almoguera C, Shibata D, Forrester K, et al. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes [J]. *Cell*, 1988, 53: 549-554.
- [2] Tada M, Omata M, Ohto M. Clinical application of ras gene mutation for diagnosis of pancreatic adenocarcinoma [J]. *Gastroenterology*, 1991, 100: 233-238.
- [3] Hurban RH, Mansfield AD, Offerhaus GJ, et al. K-ras oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinoma using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization [J]. *Am J Pathol*, 1993, 143: 545-554.
- [4] Lemoine NR, Sunjay J, Hughes CM, et al. K-ras oncogene activation in preinvasive pancreatic cancer [J]. *Gastroenterology*, 1992, 102: 230-236.
- [5] 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.
- [6] Teresa A, Brentnall, Ru Chen, et al. Microsatellite instability and K-ras mutations associated with pancreatic adenocarcinoma and pancreatitis [J]. *Cancer research*, 1995, 55: 4264-4267.
- [7] 董宝玮. 临床介入性超声学 [M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1990, 167-170.
- [8] 赵玉沛, 廖泉, 蔡力行, 等. 应用 ras 基因突变检测诊断胰腺癌 [J]. *中华普通外科杂志*, 1997, 12(4): 198-200.
- [9] Tada M, Omata M, et al. Ras gene mutations intraductal papillary neoplasms of the pancreas. Analysis of five cases [J]. *Cancer*, 1991, 67: 634-637.
- [10] Yashiro T, Fulton N, Hara H, et al. Comparison of mutations of ras oncogene in human pancreatic exocrine and endocrine tumors [J]. *Surgery*, 1993, 114: 758-761.
- [11] Urban J, Ricci S, Grange JD, et al. Detection of c-K-ras mutation by PCR/RFLP analysis and diagnosis of pancreatic adenocarcinoma [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1993, 15: 2008-2012.
- [12] Villanueva A, Reyes G, Cautrecasas M, et al. Diagnostic utility of K-ras mutations in fine-needle aspirates of pancreatic masses [J]. *Gastroenterology*, 1996, 110: 1587-1594.
- [13] 王志永, 刘彤华, 崔全才, 等. 胰腺癌的基因诊断 [J]. *中华病理学杂志*, 1994, 23(5): 270-272.
- [14] 郑敏, 肖竹影, 刘连新, 等. 超声引导下细针穿刺胰腺癌基因诊断 [J]. *中国超声医学杂志*, 2000, 16(7): 523-525.