

# KRAS、BRAF 及 PIK3CA 基因突变与转移性结直肠癌的关系

李洪涛<sup>1</sup>, 刘宏斌<sup>1</sup>, 赵青川<sup>2</sup>, 韩晓鹏<sup>1</sup>, 朱万坤<sup>1</sup>, 苏琳<sup>1</sup>

1. 兰州军区兰州总医院普通外科, 兰州 730050

2. 第四军医大学西京消化病医院, 西安 710032

**摘要** 为了联合检测并分析 KRAS、BRAF 和 PIK3CA 突变与临床病理指标之间的关系, 探讨基因突变在结直肠癌(CRC)发生、发展中的生物学意义, 收集第四军医大学西京消化病医院及兰州军区兰州总医院 2008—2009 年入院治疗的 150 例结直肠癌患者的癌组织标本, 提取 DNA 行 PCR 扩增后, 采用焦磷酸测序法联合检测 KRAS、BRAF 及 PIK3CA 基因的突变率, 统计分析基因突变与患者临床病理(包括患者的年龄、性别、肿瘤位置、Dukes 分期、TNM 分期、组织病理学分型及转移)之间的关系。结果表明, 在 150 例患者中, KRAS 突变率为 32%(48/150), BRAF 突变率为 8%(12/150), PIK3CA 突变率为 12%(18/150), 其中 9 号外显子突变率为 6%(9/150), 20 号外显子突变率为 6%(9/150)。KRAS 和 PIK3CA 的突变与患者的 Dukes 分期关系密切, KRAS、BRAF 和 PIK3CA 的突变与 CRC 患者的年龄、性别、肿瘤位置、组织病理学分型之间无明显的关系。

**关键词** 转移性结直肠癌; 基因突变; 生物学意义

中图分类号 R730.54

文献标识码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2012.19.006

## Relationship Between KRAS, BRAF and PIK3CA Mutations and Metastatic Colorectal Cancer

LI Hongtao<sup>1</sup>, LIU Hongbin<sup>1</sup>, ZHAO Qingchuan<sup>2</sup>, HAN Xiaopeng<sup>1</sup>, ZHU Wankun<sup>1</sup>, SU Lin<sup>1</sup>

1. *Depart of General Surgery, General Hospital of Lanzhou Command of PLA, Lanzhou 730050, China*

2. *Xijing Hospital of Digestive Diseases, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China*

**Abstract** In order to investigate the molecular occurrence of KRAS, BRAF and PIK3CA mutations in the colorectal cancer patients and to study the association of these events with clinicopathological parameters. Two hundred paraffin-embedded tumor specimens were collected from 150 colorectal cancer patients who underwent resection of primary tumors at Xijing Hospital of Digestive Diseases and General Hospital of Lanzhou Military Region of PLA from the year of 2008 to 2009. The DNAs are extracted from 200 cases of human colorectal cancer tissue samples. KRAS, BRAF and PIK3CA mutations analysis is performed by PCR and pyrosequencing. Using statistical methods, the relationships between the gene mutations and clinicopathological parameters are analyzed. The KRAS point mutation rate is 32% (48/150); The V600E mutation rate of BRAF is 8% (12/150); PIK3CA point mutation rate is 12% (18/150), among them, exon 9 mutation rate is 6% (9/150) and exon 20 mutation rate is 6% (9/150). The study indicates that the mutational status of BRAF is not correlated with Dukes staging, histological type, age, and gender of patients. However, strong connections are found between KRAS, PIK3CA mutations and Dukes staging (staging D, 48% (9/150)).

**Keywords** metastatic colorectal cancer; gene mutations; biological meaning

收稿日期: 2012-05-02; 修回日期: 2012-06-14

作者简介: 李洪涛, 博士, 研究方向为消化道肿瘤的微创治疗及结直肠癌的靶向治疗, 电子信箱: lihongtao528@163.com; 刘宏斌(通信作者), 主任医师, 研究方向为消化道肿瘤的微创治疗及临床防治, 电子信箱: liuhongbin999@163.com

## 0 引言

结直肠癌(CRC)是消化系统最常见的恶性肿瘤之一,每年全球新增病例约100万,至少有50万患者因其死亡<sup>[1]</sup>,死亡原因主要由于转移<sup>[2]</sup>。随着肿瘤分子生物学的发展,人们发现CRC的发生、发展与许多分子信号传导通路的调控有密切关系,其中包括表皮生长因子受体(EGFR)所介导的信号传导通路。在许多实体瘤中EGFR均有不同程度的表达,表达率最高为头颈部肿瘤,达95%—100%。CRC次之,为72%—89%,胃癌表达率为41%—64%<sup>[3]</sup>,并且EGFR表达率高的肿瘤恶性度高,侵袭力强,预后差<sup>[4]</sup>。EGFR是一种跨膜酪氨酸激酶受体,与配体结合后可引起下游信号传导通路的活化,如RAS-RAF-MEK-Erk/MAPK、PI3K-AKT-PKC-IKK和JAK-STAT。EGFR所介导的分子信号通路在CRC的发生、血管生成、侵袭和转移中起着非常重要的作用<sup>[5-6]</sup>。

以往的研究说明基因突变及分子信号通路的激活导致了CRC的形成及发展,但这些分子事件与患者的年龄、性别、TNM分期、转移等临床病理特点之间的关系尚不明确,并且中国人群CRC患者中这些基因突变情况的相关研究资料尚不充分。本文通过检测CRC患者中*KRAS*、*BRAF*及*PIK3CA*3个基因常见位点的突变情况,了解基因突变和临床病理学特征之间的关系,尤其是基因突变和MCRC(转移性结直肠癌)的关系,探讨它们在CRC中的生物学行为。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

收集2008年12月—2009年12月入住兰州军区兰州总医院及第四军医大学西京消化病医院手术切除后的癌组织石蜡标本150例,并收集每例患者临床资料。所有病例都有明确的病理学诊断,均为CRC,癌组织标本量充足,可以进行分子生物学的检测。患者的临床及病理资料见表1。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 DNA样本提取和*KRAS*、*BRAF*及*PIK3CA*基因的PCR扩增反应

使用E.Z.N.A™ FFPE组织DNA提取试剂盒,从石蜡组织中提取DNA样本。将提取DNA加样于2%的琼脂糖凝胶,鉴定所提取DNA纯度。本文的目的基因分别为*KRAS*、*BRAF*和*PIK3CA*。*KRAS*的突变主要发生在1号外显子的第12、13号密码子,*BRAF*的突变发生在15号外显子的第600号密码子,*PIK3CA*的突变主要发生在9和20号外显子的第542、545、1047和1049号密码子。根据目的基因的碱基序列,本文采用的各个基因的PCR双向引物及测序引物序列见表2。每个PCR反应体系包括:10×PCR buffer 5μL,dNTP(2.5mmol/L)4μL,primer F(10mmol/L)0.5μL,primer R(10mmol/L)0.5μL,Hotstart Taq 0.4μL,DAN Sample 4μL,H<sub>2</sub>O 35.6μL,总反应体系为50μL。PCR反应条件为:95℃变性3min,95℃ 10s,56℃ 20s,72℃ 30s,30个热循环,最后在72℃下延伸5min,完成整个循环。将PCR扩增产物行琼脂糖凝胶电泳以鉴定PCR产物纯度。

表1 150例结直肠癌患者的临床病理资料

Table 1 Clinicopathological parameters of 150 colorectal cancer patients

		例数(n)	比例/%
性别	男	92	61.3
	女	58	38.7
年龄	≤59	73	48.7
	60-69	44	21.3
	≥70	33	14.0
肿瘤部位	右半结肠	38	25.3
	左半结肠	34	22.7
	直肠	78	52.0
Dukes分期	A	33	22.0
	B	68	45.3
	C	28	18.7
	D	21	14.0
病理组织学分型	腺癌	118	78.6
	黏液腺癌	24	16.0
	印戒细胞癌	4	2.7
	鳞状细胞癌	1	0.7
	未分化癌	3	2.0

表2 目的基因的PCR引物序列

Table 2 Sequencing primers for PCR

CR双向引物	测序引物序列
KRAS-F1	TAAGGCCTGCTGAAAATGACT
KRAS-R1	5'-Biotin-TTGGATCATATTCGTCCACAA
KRAS-S1	TTGTGGTAGTTGGAGCT
BRAF-F1	CATAATGCTTGCTCTGATAGGA
BRAF-R1	5'-Biotin-CAATTCTTACCATCCACAAAATG
BRAF-S1	GGTGATTTTGGTCTAGC
PIK3CA-9-F1	AACAGCTCAAAGCAATTTCTACAC
PIK3CA-9-R1	5'-Biotin-GGTATGGTAAAACATGCTGAGAT
PIK3CA-9-S1	AAGCAATTTCTACACGAG
PIK3CA-20-F1	GACATTGCATACATTCGAAAGAC
PIK3CA-20-R1	5'-Biotin-GTTTAATTGTGTGGAAGATCCAA
PIK3CA-20-S1	AGGCTTTGGAGTATTTTCAT

#### 1.2.2 *KRAS*、*BRAF*和*PIK3CA*基因突变的测序

焦磷酸测序是由4种酶——DNA聚合酶(DNA polymerase)、硫酸化酶(ATP sulfurylase)、荧光素酶(luciferase)和双磷酸酶(aprase)催化的酶级联反应,从而进行定量序列分析的一种测序技术。每个反应体系包括反应底物、测序引物、待测序DNA单链模板。具体步骤如下:采用瑞典Biotage公司生产的PyroMark ID焦磷酸测序仪中配套的单链纯化装置从PCR反应液中分离出1条单链DNA,并以此为模板;在测序仪中加入测序反应板进行基因测序。首先利用焦磷酸测序仪器本身具有的分析软件进行SNP位点的分析,如果存在杂合

子的位点,再进行基因频率(AQ)的分析。本文利用焦磷酸测序技术得到 *KRAS*、*BRAF* 和 *PIK3CA* 基因的测序结果。

### 1.3 统计学处理

应用 SPSS 11.5 软件行  $\chi^2$  检验。 $\alpha=0.05$  为检验水准(其中包括四格表资料的 Pearson  $\chi^2$  检验、四格表资料的  $\chi^2$  检验校正公式或 Fisher 确切概率法、配对四格表资料的  $\chi^2$  检验)。

## 2 结果与分析

### 2.1 琼脂糖凝胶电泳结果

每例癌组织标本提取的 DNA 样本及 PCR 扩增反应后产物均进行琼脂糖凝胶电泳以确定 DAN 及 PCR 扩增产物纯度。图 1 为 DNA 样本凝胶电泳图,图 2 为 *KRAS*、*BRAF*、*PIK3CA* (exon9)、*PIK3CA* (exon20)PCR 扩增产物凝胶电泳图。

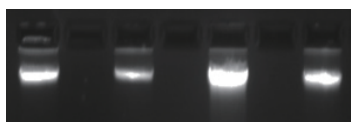


图 1 DNA 样本凝胶电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram in an agarose gel of DNA

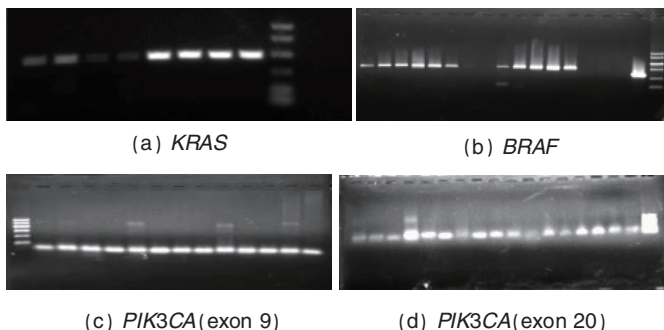


图 2 *KRAS*、*BRAF*、*PIK3CA* (exon 9)、*PIK3CA* (exon 20) 的 PCR 扩增产物凝胶电泳图

Fig. 2 Electrophoretogram in an agarose gel of *KRAS*, *BRAF* and *PIK3CA* (exon 9, exon 20)

### 2.2 *KRAS*、*BRAF* 和 *PIK3CA* 基因突变的测序结果

在收集的 150 例 CRC 组织的石蜡标本中,共检测到 *KRAS* 突变患者 48 例,突变率为 32%(48/150);*BRAF* 突变患者 12 例,突变率为 8%(12/150);*PIK3CA* 突变患者 18 例,突变率为 12%(18/150)。结果见表 3。*KRAS* 突变主要发生在 1

表 3 *KRAS*、*BRAF* 和 *PIK3CA* 基因突变率

Table 3 Frequencies of *KRAS*, *BRAF* and *PIK3CA* mutations

	<i>KRAS</i>		<i>BRAF</i>		<i>PIK3CA</i>	
	W	M	W	M	W	M
例数	102	48	138	12	132	18
百分率/%	68	32	92	8	88	12

注:W,野生型;M,突变型。

Notes: W, wild-type; M, mutation.

号外显子的 12 号密码子 (GGT-GAT、GGT-GCT、GGT-GTT、GGT-TGT)和 13 号密码子(GGC-GAC),*BRAF* 的突变主要发生在 15 号外显子的 600 号密码子(GTG-GAG),*PIK3CA* 的突变主要发生在 9 号外显子的 542 (GAA-AAA)、545 (GAG-CAG) 号密码子和 20 号外显子的 1047 (CAT-CGT、CAT-CAG)、1049(GGT-GGC)号密码子。

### 2.3 *KRAS*、*BRAF* 和 *PIK3CA* 突变与 CRC 的 Dukes 分期之间的关系

根据 Dukes 分期标准及临床资料,将患者分为 4 期——A (T1-2N0M0,33/150,22%)、B (T3-4N0M0,68/150,45.3%)、C (T1-4N1-3M0,28/150,18.7%)、D (T1-4N0-3M1,21/150,14%)。结果表明,*KRAS* 基因在 A、B、C 及 D 期患者中的突变率分别为 24%(8/33)、29%(20/68)、21%(6/28) 和 67%(14/21),*BRAF* 基因的突变率分别为 0、7%(5/68)、14%(4/28) 和 14%(3/21),*PIK3CA* 基因在 A、B、C 及 D 期患者中的突变率分别为 4%(2/33)、7%(5/68)、11%(4/28) 和 48%(10/21)。从表 4 可以看出,*KRAS* 和 *BRAF* 的突变不可同时存在于同一患者中,而 *KRAS* 和 *PIK3CA* 的突变可以同时发生。*KRAS* 和 *PIK3CA* 的突变和 CRC 的 Dukes 分期有显著的关系,采用卡方检验进行统计学分析,结果具有统计学意义 ( $P$  值分别为 0.002224 和 0.02825),相反 *BRAF* 的突变和 CRC 的 Dukes 分期无明显关系( $P=0.1116$ )。随着 CRC 的 Dukes 分期的升高、*KRAS* 及 *PIK3CA* 的突变率也升高。值得注意的是,Dukes D 期的 CRC 患者中 *KRAS* 及 *PIK3CA* 的突变明显增多 (48%=12/21, $P<0.05$ ),因此可以推论 *KRAS* 及 *PIK3CA* 的突变与结直肠癌的远处转移密切相关。此外,从表 5 可以看出,*KRAS*、*BRAF* 和 *PIK3CA* 的突变与患者的年龄、性别、肿瘤的部位及组织病理学类型无明显的关联( $P>0.05$ )。

表 4 *KRAS*、*BRAF* 和 *PIK3CA* 突变与结直肠癌 Dukes 分期之间的关系

Table 4 Relationship between *KRAS*, *BRAF* and *PIK3CA* mutations and Dukes staging

分期	TNM	例数(n)	<i>KRAS</i> 突变		<i>BRAF</i> 突变		<i>PIK3CA</i> 突变	
			n/%	P	n/%	P	n/%	P
A	T1-2N0M0	33	8(24)		0		2(4)	
B	T3-4N0M0	68	20(29)	0.002224	5(7)	0.1116	5(7)	0.02825
C	T1-4N1-3M0	28	6(21)	$\chi^2=14.5692$	4(14)	$\chi^2=6$	4(11)	$\chi^2=9.08$
D	T1-4N0-3M1	21	14(67)		3(14)		10(48)	

表 5 *KRAS*、*BRAF* 及 *PIK3CA* 与临床病理学特征之间的关系

 Table 5 Relationship between *KRAS*, *BRAF* and *PIK3CA* mutation and clinicopathological parameters

	例数( <i>n</i> )	<i>KRAS</i> 突变		<i>BRAF</i> 突变		<i>PIK3CA</i> 突变	
		<i>n</i> /%	<i>P</i>	<i>n</i> /%	<i>P</i>	<i>n</i> /%	<i>P</i>
性别	男	92	25(27)	10(11)		12(13)	
	女	58	21(37)	1(2)		7(12)	
年龄	≤59	73	28(38)	7(9)		11(15)	
	60—69	44	13(30)	2(5)	>0.05	4(8)	>0.05
	≥70	33	7(21)	2(7)		5(14)	
肿瘤位置	左半结肠	38	12(34)	6(16)		4(11)	
	右半结肠	34	11(33)	1(4)	>0.05	7(21)	>0.05
	直肠	78	23(30)	4(5)		7(9)	
组织学分型	腺癌	118	33(28)	9(8)		14(12)	
	黏液腺癌	24	10(44)	0		4(15)	
	印戒细胞癌	4	3(67)	1(17)	>0.05	1(33)	>0.05
	鳞状细胞癌	1	0	0		0	
	未分化癌	3	0	0		0	

### 3 讨论

CRC 的发病率位于全球恶性肿瘤的第 3 位,约有 25% 的患者初诊时发现存在肝脏、肺脏等远处器官的转移,并且 MCRC 患者的 5 年存活率低于 10%<sup>[7]</sup>。在过去的 10 年中,随着分子生物学和细胞生物学的发展,对 CRC 的形成及发展机制有了更加深入的了解和认识。广大学者现一致认为表皮生长因子受体(EGFR)所介导的下游信号传导通路,如 RAS/RAF/MAPK、PI3K/AKT 通路的持续激活与 CRC 的发生、发展密切相关<sup>[8]</sup>。而 *KRAS*、*BRAF* 和 *PIK3CA* 癌基因的突变是导致上述分子信号通路持续活化的原因之一。近年来针对 EGFR 等靶点的治疗,使 CRC 的治疗已由原来的手术加放、化疗进展到靶向治疗的新时代。

抗 EGFR 的单克隆抗体(西妥昔单抗和帕尼单抗)的临床应用明显改善 CRC,尤其是 MCRC 患者的治疗效果,C225 联合 FOLFIRI 或 FOLFOX 的治疗在 MCRC 的一线治疗中显示了巨大的优势<sup>[9]</sup>。C225 可以阻止 EGFR 与其配体的结合,阻断受体的二聚体化,抑制下游分子信号传导通路的激活,从而影响与肿瘤生长和转移相关的细胞功能,包括细胞的增殖、新生血管的生成和细胞的凋亡等<sup>[10-11]</sup>。大量临床研究证实,C225 仅适用于 *KRAS* 野生型的 CRC 患者,*KRAS* 基因已经成为预测 C225 疗效的生物学标志物<sup>[12-13]</sup>。然而在随后的临床应用中发现,即使是 *KRAS* 野生型患者仍有部分人群对 C225 抗体的治疗缺乏敏感性<sup>[14]</sup>。最近的研究表明,*BRAF* 和 *PIK3CA* 基因的突变和 C225 治疗的低反应率有明显的关系<sup>[15]</sup>。但是 *BRAF* 和 *PIK3CA* 等分子能否成为预测 C225 疗效的生物学标志物,并广泛应用于临床,仍需进一步的研究和证实。

许多研究报道了在西方人群中,CRC 患者的 *KRAS*、*BRAF* 和 *PIK3CA* 的突变率<sup>[8,16]</sup>,但有关中国 CRC 患者的 *KRAS*、*BRAF* 和 *PIK3CA* 的突变发生率尚不清楚,已有的也只

为小样本的结果。另外有文献报道称 CRC 患者中,*KRAS* 的突变与息肉样腺癌的关系密切<sup>[17]</sup>。但目前有关基因突变和患者临床病理特征之间关系尚不明确,并且存在一定的争议。因此本文旨在研究中西方人群中 CRC 患者的 *KRAS*、*BRAF* 和 *PIK3CA* 的突变率是否存在差别,探讨 *KRAS*、*BRAF* 和 *PIK3CA* 基因的突变与 CRC 临床病理学特征之间有无关系,期望能发现一些 MCRC 危险因素的预测因子。

本文收集了 150 例 CRC 患者手术切除的癌组织石蜡标本,采用焦磷酸测序技术检测 *KRAS*、*BRAF* 和 *PIK3CA* 的突变率。焦磷酸测序技术是一种切实可行的测序技术,它的灵敏程度远高于其他测序方法<sup>[18]</sup>。结果表明,在 150 例患者中,*KRAS*、*BRAF* 和 *PIK3CA* 的突变率和文献报道的大体一致<sup>[19-22]</sup>。因此中西方人群中 CRC 患者的 *KRAS*、*BRAF* 和 *PIK3CA* 的突变率无明显差别。

据报道,在 CRC 的发展过程中,*KRAS* 和 *PIK3CA* 的突变对 PI3K/AKT 通路的活化有协同作用<sup>[23]</sup>,并且 *KRAS* 和 *PIK3CA* 的突变与 CRC 的分期、分级有一定的关系<sup>[23]</sup>。本文利用 150 例 CRC 患者的癌组织标本发现,*KRAS* 和 *BRAF* 的突变在同一患者中不可同时存在,而 *KRAS* 和 *PIK3CA* 的突变可以同时发生。*KRAS*、*BRAF* 和 *PIK3CA* 的突变与 CRC 患者的年龄、性别、肿瘤位置、组织病理学分型之间无明显的关系。然而 *KRAS* 和 *PIK3CA* 的突变与患者的 Dukes 分期之间的关系密切,相比之下,*BRAF* 的突变和 Dukes 分期无明显的关联。

研究发现,CRC 患者的 Dukes 分期越高,*KRAS* 与 *PIK3CA* 的突变率越高,并且 *PIK3CA* 的突变与 *KRAS* 的突变关系密切,*KRAS* 突变型的 CRC 患者中 *PIK3CA* 的突变增多,尤其在 *KRAS* 突变型的 Dukes D 期的 CRC 患者中,*PIK3CA* 突变的发生率明显增多。基于以上数据可以推断:*KRAS* 和 *PIK3CA* 基因的突变与 CRC 患者的远处转移密切相关。当然此结果仍需大样本的临床研究去验证。

目前关于 *KRAS* 和 *PIK3CA* 和 CRC 患者预后的关系,即 *KRAS* 和 *PIK3CA* 能否做为 CRC 的预后因子等问题,尚存在一定的争议<sup>[24-25]</sup>。众所周知,MCRC 患者的预后较差,5 年生存率仍较低。本文研究发现,*KRAS*、*PIK3CA* 的突变与 CRC 的肝转移有显著的关系,因此,CRC 患者如存在 *KRAS*、*PIK3CA* 的突变,其预后较差。*KRAS* 和 *PIK3CA* 的突变可能成为判断 CRC 患者转归和预后的生物学标志物。本文研究仍存在一定的缺陷,如样本量较小,且缺少患者的随访资料。

肿瘤的形成是多因素共同作用的结果,基因突变和分子通路的激活在 CRC、胃癌等恶性肿瘤中的地位得到了充分的肯定。近年来针对以个别基因和分子为靶点的靶向治疗取得了突破性的进展,但仍存在一定的问题。因此,加强对分子信号通路及相关基因的研究,可以更加深刻地认识 CRC 的发生、发展机制,推动以靶向治疗为基础的 CRC 个体化治疗的进程,具有深远的临床意义。

#### 4 结论

*KRAS* 和 *PIK3CA* 的突变与患者的 Dukes 分期关系密切,*KRAS*、*BRAF* 和 *PIK3CA* 的突变与 CRC 患者的年龄、性别、肿瘤位置、组织病理学分型之间无明显的关系。

#### 参考文献 (References)

- [1] Ferlay J, Bray F, Pisani P, et al. GLOBOCAN 2000: Cancer incidence, mortality and prevalence world wide, Version 1.0 IARC Cancer Base No. 5[R]. Lyon: IARC, 2001.
- [2] Meyerhardt J A, Mayer R J. Systemic therapy for colorectal cancer[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2005, 352(5): 476-487.
- [3] Porebska I, Harlozinska A, Bojarowski T. Expression of the tyrosine kinase activity growth factor receptors (EGFR, ERB B2, ERB B3) in colorectal adenocarcinomas and adenomas [J]. *Tumour Biology*, 2000, 21(2): 105-115.
- [4] Goldstein N S, Armin M. Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: Implications for a standardized scoring system[J]. *Cancer*, 2001, 92(5): 1331-1346.
- [5] Bergstrom J D, Westermark B, Heldin N E. Epidermal growth factor receptor signaling activates met in human anaplastic thyroid carcinoma cells[J]. *Experimental Cell Research*, 2000, 259(1): 292-299.
- [6] Denning M F, Dlugosz A A, Cheng C, et al. Cross-talk between epidermal growth factor receptor and protein kinase C during calcium-induced differentiation of keratinocytes [J]. *Experimental Dermatology*, 2000, 9(3):192-199.
- [7] Jemal A, Clegg L X, Ward E, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival[J]. *Cancer*, 2004, 101(1): 3-27.
- [8] Barault L, Veyries N, Jooste V, et al. Mutations in the RAS-MAPK, PI(3)K (phosphatidylinositol-3-OH kinase) signaling network correlate with poor survival in a population-based series of colon cancers [J]. *International Journal of Cancer*, 2008, 122(17): 2255-2259.
- [9] Van Cutsem E, Kohne C H, Hitre E, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer [J]. *The New England Journal of Medicine*, 2009, 360(14): 1408-1417.
- [10] Harding J, Burtne B. Cetuximab: An epidermal growth factor receptor chimeric human-murine monoclonal antibody [J]. *Drugs Today (Banc)*, 2005, 41(2): 107-127.
- [11] Scaltriti M, Baselga J. The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy [J]. *Clinical Cancer Research*, 2006, 12(18): 5268-5272.
- [12] Tol J, Dijkstra J R, Klomp M, et al. Markers for EGFR pathway activation as predictor of outcome in metastatic colorectal cancer patients treated with or without cetuximab [J]. *International Journal of Cancer*, 2010; 46(11): 1997-2009.
- [13] Qiu L X, Mao C, Zhang J, et al. Predictive and prognostic value of *KRAS* mutations in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab: A meta-analysis of 22 studies [J]. *International Journal of Cancer*, 2010, 46(15): 2781-2787.
- [14] Allegra C J, Jessup J M, Somerfield M R, 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]. *Journal of Clinical Oncology*, 2009, 27(12): 2091-2096.
- [15] De Roock W, Claes B, Bernasconi D, et al. Effects of *KRAS*, *BRAF*, *NRAS*, and *PIK3CA* mutations on the efficacy of Cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis[J]. *Lancet Oncology*, 2010, 11(8): 753-762.
- [16] Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, et al. High frequency of mutations of the *PIK3CA* gene in human cancers[J]. *Science*, 2004, 304(5670): 554-561.
- [17] Chiang J M. Role of K-ras mutations in colorectal carcinoma[J]. *Cancer Letters*, 1998, 126(26): 179-185.
- [18] Miyaki M, Iijima T, Yamaguchi T, et al. Mutations of the *PIK3CA* gene in hereditary colorectal cancers [J]. *International Journal of Cancer*, 2007, 121(7): 1627-1630.
- [19] Glarakis I S, Savva S, Spandidos D A. Activation of the ras genes in malignant and premalignant colorectal tumors [J]. *Oncology Reports*, 1998, 5(6): 1451-1454.
- [20] Ogino S, Kawasaki T, Brahmandam M, et al. Sensitive sequencing method for *KRAS* mutation detection by Pyrosequencing [J]. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2005, 7(3): 413-421.
- [21] Kato S, Iida S, Higuchi T, et al. *PIK3CA* mutation is predictive of poor survival in patients with colorectal cancer [J]. *International Journal of Cancer*, 2007, 121(8): 1771-1778.
- [22] Benvenuti S, Frattini M, Arena S, et al. *PIK3CA* cancer mutations display gender and tissue specificity patterns [J]. *Human Mutation*, 2008, 29(2): 284-288.
- [23] Tol J, Nagtegaal I D, Punt C J. *BRAF* mutation in metastatic colorectal cancer[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2009, 361(1): 98-99.
- [24] Richman S D, Seymour M T, Chambers P, et al. *KRAS* and *BRAF* mutations in advanced colorectal cancer are associated with poor prognosis but do not preclude benefit from oxaliplatin or irinotecan: Results from the MRC FOCUS trial [J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2009, 27(35): 5931-5937.
- [25] Ogino S, Noshio K, Kirkner G J, et al. *PIK3CA* mutation is associated with poor prognosis among patients with curatively resected colon cancer [J]. *Journal of Clinical Oncology*, 2009, 27(9): 1477-1484.

(责任编辑 安莹,吴晓丽)