

# 结直肠癌患者血清外泌体与组织中 KRAS, BRAF, NRAS 和 PIK3CA 基因突变检测及临床意义的比较

靳 杨<sup>1</sup>, 姜利琼<sup>2</sup>, 房 烨<sup>1</sup>, 曾燕兰<sup>1</sup>, 何 毅<sup>1</sup>, 边革元<sup>1</sup> (1. 中国人民解放军联勤保障部队第九二〇医院重症医学科, 昆明 650032; 2. 云南省阜外心血管病医院健康管理中心, 昆明 650102)

**摘要:** 目的 检测结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 患者血清外泌体 KRAS, BRAF, NRAS 和 PIK3CA 相关基因位点的突变, 分析其与癌组织基因突变的一致性及其可能的影响因素。方法 2019 年 2 月 ~ 2021 年 1 月中国人民解放军联勤保障部队第九二〇医院 100 例结直肠癌患者作为研究对象。提取患者血清外泌体, 并用蛋白免疫印迹 (Western blot, WB) 法检测外泌体标志物 CD63 和 TSG101 的蛋白表达; 聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 检测血清外泌体及手术切除的癌组织中 KRAS, BRAF, NRAS 和 PIK3CA 基因突变情况, Kappa 一致性检验分析血清外泌体突变与组织突变的一致性, Logistic 单因素回归分析影响一致性的因素。结果 癌症基因组图谱 (the cancer genome atlas, TCGA) 数据显示, KRAS, BRAF, NRAS 和 PIK3CA 的结直肠癌突变率分别为 35% ~ 96%, 5% ~ 15%, 5% ~ 30% 和 18% ~ 36%, 且 KRAS 和 BRAF 的突变与结直肠癌患者的低存活率有关。血清外泌体中 KRAS, BRAF, NRAS 和 PIK3CA 的突变率分别为 94.00%, 11.00%, 17.00% 和 35.00%; 结直肠癌组织 KRAS, BRAF, NRAS 和 PIK3CA 的突变率分别为 34.00%, 5.00%, 6.00% 和 16.00%; 血清外泌体中 KRAS, BRAF, NRAS 和 PIK3CA 的突变率均高于组织, 差异有统计学意义 ( $\chi^2=101.027 \sim 256.250$ , 均  $P < 0.05$ )。血清外泌体与组织中 KRAS 突变的一致率为 40.00% (Kappa 值 = 0.064,  $P > 0.05$ ), BRAF 突变的一致率为 99.00% (Kappa 值 = 0.599,  $P < 0.05$ ), NRAS 突变的一致率为 89.00% (Kappa 值 = 0.475,  $P < 0.05$ ), KRAS 突变的一致率为 81.00% (Kappa 值 = 0.523,  $P < 0.05$ )。ECOG 评分、转移、临床分期是影响外泌体和组织 KRAS, BRAF, NRAS 和 PIK3CA 的突变检测一致性的因素。结论 结直肠癌患者血清外泌体 KRAS, BRAF, NRAS 和 PIK3CA 的突变率高于组织, 二者 BRAF, NRAS 和 PIK3CA 的一致性中等, 为外泌体的基因检测指导临床靶向治疗提供参考。

**关键词:** 结直肠癌; 血清外泌体; 基因突变

**中图分类号:** R735.3; R730.43 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2023) 01-022-05

**doi:** 10.3969/j.issn.1671-7414.2023.01.005

## Comparison of KRAS, BRAF, NRAS and PIK3CA Gene Mutations in Serum Exosomes and Tissues of Patients with Colorectal Cancer and Their Clinical Significance

JIN Yang<sup>1</sup>, JIANG Li-qiong<sup>2</sup>, FANG Ye<sup>1</sup>, ZENG Yan-lan<sup>1</sup>, HE Yi<sup>1</sup>, BIAN Ge-yuan<sup>1</sup>

(1. Department of Critical Care Medicine, No. 920 Hospital, Joint Logistics Support Force of the Chinese People's Liberation Army, Kunming 650032, China; 2. Health Management Center, Fuwai Cardiovascular Hospital of Yunnan Province, Kunming 650102, China)

**Abstract: Objective** To detect the mutations loci in exosomes related gene of KRAS, BRAF, NRAS and PIK3CA in patients with colorectal cancer (CRC), and analyze the consistency with cancer tissue gene mutations and its possible influencing factors. **Methods** From February 2019 to January 2021, 100 patients with colorectal cancer in the No. 920 Hospital of the Joint Logistics Support Force of the Chinese People's Liberation Army were selected as the research object. The serum exosomes of patients were extracted, and the protein expressions of exosomes markers CD63 and TSG101 were detected by Western blot (WB). Detection of KRAS, BRAF, NRAS and PIK3CA gene mutations in serum exosomes and surgically resected cancer tissues by polymerase chain reaction (PCR). Kappa consistency test was used to analyze the consistency between serum exosome mutations and tissue mutations. Logistic univariate regression was used to analyze the factors affecting the consistency. **Results**

**基金项目:** 联勤保障部队第九二〇医院院内科科技计划《外泌体 DNA 检测指导大肠癌患者个体化治疗的可行性研究》, 课题编号: 2019YGC01。

**作者简介:** 靳杨 (1987-), 女, 博士, 主治医师, 研究方向: 肿瘤精准医疗及危重症救治, E-mail: fecesathe70@21cn.com。

**通讯作者:** 边革元 (1966-), 男, 本科, 主任医师, 研究方向: 肿瘤危重症救治, E-mail: fecesathe70@21cn.com。

The cancer genome atlas (TCGA) data showed that the mutation rates of KRAS, BRAF, NRAS and PIK3CA were 35% ~ 96%, 5% ~ 15%, 5% ~ 30% and 18% ~ 36%, respectively, and the mutations of KRAS and BRAF were related to the low survival rate of colorectal cancer patients. The mutation rates of KRAS, BRAF, NRAS and PIK3CA in serum exosomes were 94.00%, 11.00%, 17.00% and 35.00% respectively. The mutation rates of KRAS, BRAF, NRAS and PIK3CA in tissues were 34.00%, 5.00%, 6.00% and 16.00% respectively. The results of tissue gene testing were provided by the clinical pathology laboratory, the mutation rates of KRAS, BRAF, NRAS and PIK3CA in serum exosomes were higher than those in tissues, and the differences were statistically significant ( $\chi^2=101.027 \sim 256.250$ , all  $P < 0.05$ ). The consistency rate of KRAS mutation in serum exosomes and tissues was 40.00% (Kappa value = 0.064,  $P > 0.05$ ), BRAF mutation was 99.00% (Kappa value = 0.599,  $P < 0.05$ ), NRAS mutation was 89.00% (Kappa value = 0.475,  $P < 0.05$ ), and KRAS mutation was 81.00% (Kappa value = 0.523,  $P < 0.05$ ). The consistency of ECOG score, metastasis and staging of patients is high. **Conclusion** The mutation rates of serum exosomes KRAS, BRAF, NRAS and PIK3CA in colorectal cancer patients were higher than those in tissues, and the consistency of BRAF, NRAS and PIK3CA was moderate, which may provide a reference for exosomes gene detection to guide clinical targeted therapy.

**Keywords:** colorectal cancer; serum exosomes; gene mutation

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是消化系统最常见的恶性肿瘤, 占所有癌症死亡患者的 10%, 约 25% 的患者在临床确诊时已至晚期, 失去了手术的最佳时机<sup>[1-2]</sup>。如何针对个体制定靶向药的用药方案, 成为延长患者存活时间的关键问题。目前, 组织病理学检测是癌症诊断、治疗的金标准, 也是患者个体化治疗的前提。由于组织学检测的局限性, 临床上迫切需要新的替代检测方法<sup>[3-4]</sup>。KRAS, BRAF, NRAS 和 PIK3CA 基因的突变预示着表皮生长因子靶向药的脱靶, 失去治疗效果<sup>[5-8]</sup>。血清外泌体具有取材方便、丰富、稳定、不受时间限制、易保存等优点, 已被研究证实结直肠癌组织 KRAS, BRAF, NRAS 和 PIK3CA 基因突变具有临床诊断、预后价值<sup>[9]</sup>。但结直肠癌患者血清外泌体 KRAS, BRAF, NRAS 和 PIK3CA 基因突变是否可替代组织学检测及影响血清外泌体基因突变的因素均需深入探究。

## 1 材料与方法

**1.1 研究对象** 收集 2019 年 2 月 ~ 2021 年 1 月中国人民解放军联勤保障部队第九二〇医院接收的 100 例结直肠癌患者作为研究对象。纳入本次实验的 100 例患者情况: 男性 55 例, 女性 45 例, 平均年龄 56 岁。美国东部肿瘤协作组 (Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG) 评分显示, 其中 0 分患者 17 例, 1 分患者 77 例, 2 分患者 4 例, 3 分以上患者 2 例。未发生转移患者 30 例, 发生转移患者 70 例; 其中 I ~ IIA 患者 13 例, IIB~C 期患者 19 例, IIIA~C 期患者 47 例, IV 期患者 21 例。患者均签署知情同意书, 且该研究得到医院伦理委员会批准。纳入标准: ①符合中国结直肠癌筛查与早诊早治指南 (2020, 北京)<sup>[10]</sup>, 且内镜诊断、病理诊断均阳性; ②自愿加入, 积极配合实验开展。排除标准: ①并发 2 种及以上的肿瘤; ②存活时间不足 3 个月者; ③使用过化学药物治疗者; ④精神

状态不良者。

**1.2 仪器与试剂** 血清血浆外泌体提取试剂盒 (上海宇劲生物技术有限公司); 外泌体 DNA/RNA 提取试剂盒 (北京百奥莱博科技有限公司); 快速 DNA 提取检测试剂盒 (北京天根科技有限公司); 兔抗人 CD63 多抗 (美国 System Biosciences 公司); 兔抗人 TSG101 单抗 (美国 Abcam 公司); 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗兔二抗 (北京中杉金桥公司); 2K15C 台式离心机 (美国 Sigma 公司); -80℃超低温保存箱 (青岛海尔公司); 电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); 凝胶成像仪 (北京宾达英创科技有限公司); PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

## 1.3 方法

**1.3.1 标本采集:** 结直肠癌患者在接受手术治疗前采集清晨空腹静脉血, 3 000 r/min 离心 15 min, 去除细胞及细胞碎片, 保留血清, 存放于 -20℃; 手术切除结直肠癌组织标本, 存放于液氮。

**1.3.2 癌症基因组图谱 (the cancer genome atlas, TCGA) 数据分析:** 通过 Cbioportal (<http://www.cbioportal.org>) 中 TCGA 数据分别检索结直肠癌 KRAS, BRAF, NRAS 和 PIK3CA 的突变。

**1.3.3 血清外泌体提取、鉴定<sup>[11]</sup>:** 按照血清血浆外泌体提取试剂盒说明书要求操作, 血清 500  $\mu$ l 加入 120  $\mu$ l ExoQuick 试剂混匀, 4℃冰箱中静置 30 min; 1 500  $\times$  g 离心 30 min, 弃去上清, 将沉淀再次离心, 弃去上清, 所得沉淀即为外泌体。

使用蛋白免疫印迹 (Western blot, WB) 法检测外泌体中标志蛋白 CD63 和 TSG101 的表达。将上述沉淀中的外泌体制成悬液, 二奎啉甲酸法 (bicinchoninic acid, BCA) 试剂盒定量、变性, 作为十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 蛋白电泳的上样模板。严格按照 WB 常规实验操作流程操作。

**1.3.4 血清外泌体、组织样本 DNA 提取:** 使用

外泌体 DNA/RNA 提取试剂盒收集血清外泌体 DNA, 快速 DNA 提取检测试剂盒提取组织样本中的 DNA。具体操作按照各自试剂盒的操作说明书进行。

以 DNA 为模板, 取引物各 2  $\mu$ l, 模板 2  $\mu$ l, 无菌去离子水补至 12.50  $\mu$ l。PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 72 $^{\circ}$ C 保存 10 min, 循环 30 次, 扩

增后的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定。配制 3 g/dl 的琼脂糖凝胶。按照预先设计好的加样顺序在各孔依次加样: 每孔 8  $\mu$ l; 在每行最右边点样孔加入 5  $\mu$ l 100 bp DNA Ladder; 盖好电泳槽盖子, 电压调至 120 V, 开始电泳; 当蓝色素跑到凝胶的 2/3 左右, 约 40 min 时断掉电源, 将凝胶取出, 放在紫外灯下观察, 在凝胶成像仪中成像并拍照。所用引物见表 1。

表 1 引物信息

基因位点	引物序列	产物长度 (bp)
KRAS G12 G13	5' CCTGCTGAAATGACTGAATATA 3' TCTATTGTTGGATCATATTTCGTC	120
KRAS Q61	5' AATTGATGGAGAAACCTGTCTCTT 3' TTATGGCAAATACACAAAGAAAGC	119
BRAF V600	5' TGCTTGCTCTGATAGGAAAATGA 3' TCCAGACAACCTGTTCAAACCTGATG	161
NRAS Q61	5' ACAAGTGTTTATAGATGTTGAAAC 3' ATTATTGATGGCAAATACACAGAG	133
PIK3CA E542 E545	5' AGCTAGAGACAATGAATTAAGGGA 3' TAGCACTTACCTGTGACTCCATAG	124
PIK3CA H1047	5' ATTCGAAAGACCCTAGCCTTAGAT 3' CCATTTTGTGTGCCAGCCAC	103

1.3.5 外泌体、组织基因检测: 进行测序分析的是 PCR 扩增产物。测序样品要求: 样品总量在 1  $\mu$ g 以上,  $A_{260nm}/A_{280nm}$  波长吸光度比值在 1.8 ~ 2.2 之间, 浓度大于 10 ng/ $\mu$ l, 将 PCR 扩增产物打包, 送检。使用 Illumina HiSeq 2500 平台进行二代测序, 测序长度 2  $\times$  125 bp。检测 KRAS 第 2 号外显子 (G12, G13), KRAS 第 3 号外显子 (Q16), BRAF 第 15 号外显子 (V600E), PIK3CA 第 21 号外显子 (E545, E542, H1047) 的突变。

1.4 统计学分析 SPSS 26.0 软件分析数据。血清外泌体、组织中 KRAS, BRAF, NRAS 和 PIK3CA 基因突变的比较采用 Kappa 一致性检验。计数资料采用例 (百分率) [n(%)] 表示, 卡方检验进行比较分析。采用 logistic 单因素回归分析, 一致性的影响因素。检验水准  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

2.1 TCGA 数据库 KRAS, BRAF, NRAS 和 PIK3CA 基因突变 通过 Cbioportal (<http://www.cbioportal.org>) TCGA 数据分析显示: KRAS 在结肠癌中的突变率在 35% ~ 96% 之间, BRAF 在结肠癌中的突变率在 5% ~ 15% 之间, NRAS 在结肠癌中的突

变率在 5% ~ 30% 之间, PIK3CA 在结肠癌中的突变率在 18% ~ 36% 之间。KRAS, BRAF 突变患者的存活率显著低于野生型患者, 差异有统计学意义 ( $t=13.392, 26.931, P<0.05$ ), NRAS, PIK3CA 突变患者的存活率略低于野生型患者, 差异无统计学意义 ( $t=2.018, 0.472, P>0.05$ )。

2.2 血清外泌体的鉴定 见图 1。WB 电泳检测外泌体标志物 CD63 和 TSG101 的表达, 而提取外泌体的血清中不存在 CD63 和 TSG101 的表达。

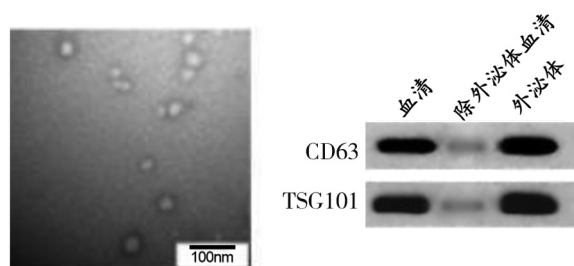
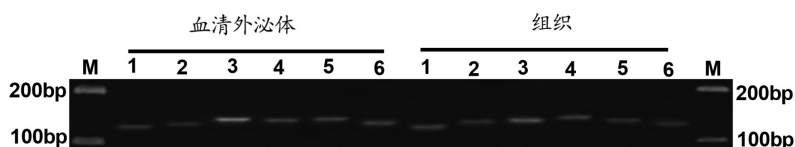


图 1 血清外泌体电镜图 (100nm,  $\times 100$ ) 及外泌体标志 CD63, TSG101 蛋白图

2.3 血清外泌体、组织的 DNA 一致性控制 见图 2。血清外泌体、组织 DNA 中 KRAS, BRAF, NRAS 和 PIK3CA 突变位点的含量。



注: M: marker; 1: KRAS G12 G13; 2: KRAS Q61; 3: BRAF V600; 4: NRAS Q61; 5: PIK3CA E542 E545; 6: PIK3CA H1047

图 2 血清外泌体、组织 DNA 的 PCR 电泳图



2.4 血清外泌体、组织中基因突变位点的检测 见表 2。血清外泌体 KRAS, BRAF, NRAS 和 PIK3CA 突变率均高于组织, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。

表 2 血清外泌体、组织中 KRAS, BRAF, NRAS 和 PIK3CA 的突变率 [ $n(\%)$ ]

基因	血清外泌体	组织	$\chi^2$ 值	$P$ 值
KRAS	94(94.00)	34(34.00)	256.250	0.000
BRAF	11(11.00)	5(5.00)	101.027	0.000
NRAS	17(17.00)	6(6.00)	111.889	0.000
PIK3CA	35(35.00)	16(16.00)	119.003	0.000

2.5 血清外泌体、组织基因突变的一致性 见表 3。血清外泌体、组织中 BRAF, NRAS 和 PIK3CA 的一致率均较好, 仅 KRAS 的一致率较差。

表 3 血清外泌体、组织中基因检测一致性比较

外泌体		组织		一致率 (%)	Kappa 值	$P$
		突变型	野生型			
KRAS	突变型	34	60	40.00	0.064	0.070
	野生型	0	6			
BRAF	突变型	5	1	99.00	0.599	0.000
	野生型	0	94			
NRAS	突变型	6	11	89.00	0.475	0.000
	野生型	0	83			
PIK3CA	突变型	16	19	81.00	0.523	0.000
	野生型	0	65			

2.6 血清外泌体、组织基因突变一致性单因素分析 见表 4。血清外泌体、组织基因突变检测的总体一致率为 40%, 检测结果中二者保持一致的有 40 例, 不一致的有 60 例。logistic 单因素回归分析影响二者一致性的影响因素, 结果所示: 患者性别、年龄与血清外泌体、组织基因突变检测一致性关系不显著, 差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 而 ECOG 评分、转移、分期与血清外泌体、组织基因突变一致性的因素, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。

3 讨论

临床上的肿瘤个体化精准治疗的方案制定离不开基因组学数据, 而进行基因检测需获取肿瘤组织, 否则就不能进行个体化精准治疗<sup>[12-13]</sup>。近 40% 的转移性结直肠癌患者无法获取肿瘤组织, 不能进行基因检测而无法接受个体化治疗, 因此, 临床上迫切需要一种替代组织的基因检测样本, 而替代肿瘤组织的液态活检成为最具潜力的检测方法。KRAS, BRAF, NRAS 和 PIK3CA 基因是与结直肠癌最为紧密的 4 个基因<sup>[14-15]</sup>, 他们在结直肠癌患者血浆循

环肿瘤 DNA, 血浆、组织中的一致性在中等以上, 并且与患者临床分期相关<sup>[16-17]</sup>。本研究通过分离 100 例结直肠癌患者血清外泌体、高通量测序法检测血清外泌体和组织中 KRAS, BRAF, NRAS 和 PIK3CA 基因突变的情况, 为血清外泌体替代组织作为结直肠癌基因突变的检测样本研究奠定基础。不足之处, 纳入的样本仅局限在本市, 也许不同地区患者的 KRAS, BRAF, NRAS 和 PIK3CA 基因突变可能存在差异, 样本量、样本来源的范围仍需扩大。

表 4 血清外泌体、组织检测一致性单因素分析 [ $n(\%)$ ]

组 别		一致 ( $n=40$ )	不一致 ( $n=60$ )	$\chi^2$	$P$
性别	男	16(40.00)	29(48.33)	2.684	0.101
	女	24(60.00)	31(51.67)		
年龄 (岁)	<65	20(50.00)	27(45.00)	0.600	0.439
	$\geq 65$	20(50.00)	33(55.00)		
ECOG 评分	0 ~ 2 分	39(97.50)	48(80.00)	57.700	0.000
	3 分以上	1(2.50)	12(20.00)		
转移	无	4(10.00)	32(53.33)	25.867	0.000
	有	36(90.00)	28(46.67)		
分期	I ~ II	14(35.00)	47(78.33)	22.867	0.000
	III ~ IV	26(65.00)	13(21.67)		

为了更全面地掌握 KRAS, BRAF, NRAS 和 PIK3CA 基因突变在结直肠癌中的情况, 本研究基于 TCGA 数据库发现: KRAS, BRAF, NRAS 和 PIK3CA 基因在结直肠癌中均有突变。除此之外, 还发现 KRAS, BRAF 基因突变患者的总体存活率显著降低, NRAS, PIK3CA 基因的突变也在一定程度上降低患者的存活率, 这也说明了基因突变的检测对结直肠癌患者具有一定的预后价值。本研究成果显示: 血清外泌体 KRAS, BRAF, NRAS 和 PIK3CA 基因突变率均高于组织基因, 暗示血清外泌体作为结直肠癌基因突变检测样本的敏感度远高于组织, 有望替代组织作为检测样本。BRAF, NRAS 和 PIK3CA 基因在血清外泌体突变与组织突变的一致性中等, KRAS 基因突变的一致率最低, 一致性较差。进一步通过 Logistic 单因素回归分析发现: 患者的 ECOG 评分、转移及临床分期是影响血清外泌体与组织 KRAS, BRAF, NRAS 和 PIK3CA 基因突变一致性的因素。KRAS 基因在血清外泌体突变率较高, 与其在 Cbioportal 网站中的结直肠癌突变相符合, 而组织中的突变率不及网站检索突变率的下限, 可能这也是 KRAS 基因在血清外泌体和组织的一致率较差的原因。可能因为本研

究纳入研究的样本量有限,该结果仍需更多样本量的支持。

本研究中外泌体 DNA 的基因突变检出率明显高于组织,同时外泌体的取材方便并无时间空间限制,因此,血清外泌体有可能成为指导患者个体化治疗的新型检测样本。不足之处:患者仅通过手术前的一次抽血进行了基因突变分析,未进行多次重复检测及治疗中、治疗后的动态监测。另外,患者在治疗过程中外泌体基因突变、各基因突变的比例与治疗效果的关系均未展开深入分析,本课题组将继续致力于此研究,为结肠癌患者的临床诊治提供更充分的理论支持。

#### 参考文献:

- [1] JIN Ketao, REN Chengcheng, LIU Yutao, et al. An update on colorectal cancer microenvironment, epigenetic and immunotherapy[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 89(Pt A):107041.
- [2] LI Jiexi, MA Xingdi, CHAKRAVARTI D, et al. Genetic and biological hallmarks of colorectal cancer[J]. *Genes & Development*, 2021, 35(11/12): 787-820.
- [3] DEKKER E, TANIS P J, VLEUGELS J, et al. Colorectal cancer[J]. *Lancet*, 2019, 394(10207): 1467-1480.
- [4] BAIDOUN F, ELSHIWY K, ELKERAIE Y, et al. Colorectal cancer epidemiology: recent trends and impact on outcomes[J]. *Current Drug Targets*, 2021, 22(9): 998-1009.
- [5] AFRĂȘĂNIE V A, MARINCA M V, ALEXA S T, et al. KRAS, NRAS, BRAF, HER2 and microsatellite instability in metastatic colorectal cancer-practical implications for the clinician[J]. *Radiology and Oncology*, 2019, 53(3): 265-274.
- [6] ZHU Gongmin, PEI Lijiao, XIA Hongwei, et al. Role of oncogenic KRAS in the prognosis, diagnosis and treatment of colorectal cancer[J]. *Molecular Cancer*, 2021, 20(1): 143.
- [7] VOUTSADAKIS I A. The landscape of PIK3CA mutations in colorectal cancer[J]. *Clinical Colorectal Cancer*, 2021, 20(3): 201-215.
- [8] PALEARI L, PUNTONI M, CLAVAREZZA M, et al. PIK3CA mutation, aspirin use after diagnosis and survival of colorectal cancer. A systematic review and meta-analysis of epidemiological studies[J]. *Clinical Oncology [Royal College of Radiologists (Great Britain)]*, 2016, 28(5): 317-326.
- [9] 靳杨. 外泌体基因检测在结直肠癌治疗中的应用[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2017. JIN Yang. Application of exosome gene detection in colorectal cancer [D]. Beijing: Academy of Military Medical Sciences of Chinese People's Liberation Army, 2017.
- [10] JIN Yang, CHEN Keyan, WANG Zongying, et al. DNA in serum extracellular vesicles is stable under different storage conditions[J]. *BMC Cancer*, 2016, 16(1): 753.
- [11] 国家癌症中心中国结直肠癌筛查与早诊早治指南制定专家组. 中国结直肠癌筛查与早诊早治指南(2020, 京)[J]. *中国肿瘤*, 2021, 30(1): 1-28. National Cancer Center, China, Expert Group of the Development of China Guideline for the Screening, Early Detection and Early Treatment of Colorectal Cancer. China guideline for the screening, early detection and early treatment of colorectal cancer (2020, Beijing) [J]. *China Cancer*, 2021, 30(1): 1-28.
- [12] WANG Yanting, MERL M Y, YANG Jun, et al. Opportunities for pharmacists to integrate pharmacogenomics into clinical practice[J]. *Pharmacogenomics Journal*, 2020, 20(2): 169-178.
- [13] 马胜辉, 崔雪琴, 李建华, 等. 结直肠癌组织 miR-485-5p, miR-1207-3p 和 miR-590-3p 水平表达与临床病理特征及生存的相关性研究[J]. *现代检验医学杂志*, 2022, 37(3): 16-20, 32. MA Shenghui, CUI Xueqin, LI Jianhua, et al. Correlation of miR-485-5p, miR-1207-3p, miR-590-3p level expression and clinicopathologic characteristics and survival in colorectal cancer tissue [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2022, 37(3): 16-20, 32.
- [14] ALEKSAKHINA S N, IMYANITOV E N. Cancer therapy guided by mutation tests: Current status and perspectives[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(20): 10931-10953.
- [15] 林志坚, 徐韞健, 温广明. KRAS, NRAS, BRAF 及 PIK3CA 基因突变与结直肠癌患者临床病理特征的关系[J]. *中华临床实验室管理电子杂志*, 2021, 9(4): 217-221. LIN Zhijian, XU Yunjian, WEN Guangming. Relationship between KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA gene mutations and clinicopathological features in colorectal cancer[J]. *Chinese Journal of Clinical Laboratory Management (Electronic Edition)*, 2021, 9(4): 217-221.
- [16] 姜惠琴, 王蓓丽, 郭玮. 晚期结直肠癌患者血浆循环肿瘤 DNA 与组织中 KRAS 及 NRAS 等基因突变一致性的影响因素分析[J]. *中华医学杂志*, 2021, 101(6): 400-404. JIANG Huiqin, WANG Beili, GUO Wei. Analysis of influencing factors of KRAS/NRAS/BRAF/PIK3CA gene mutation consistency in patients with advanced colorectal cancer[J]. *National Medical Journal of China*, 2021, 101(6): 400-404.
- [17] 刘晓娜, 田庄, 魏晓飞, 等. 联合检测结直肠癌患者血浆及组织中 KRAS, NRAS, BRAF 及 PIK3CA 基因突变情况[J]. *中华病理学杂志*, 2019, 48(5): 373-377. LIU Xiaona, TIAN Zhuang, WEI Xiaofei, et al. Combined detection of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in the plasma and tumor tissues of colorectal cancer patients[J]. *Chinese Journal of Pathology*, 2019, 48(5): 373-377.

收稿日期: 2022-07-28

修回日期: 2022-09-21