

# K-ras 12密码子点突变在胰腺癌早期诊断中的意义

周国雄,李兆申,许国铭

周国雄,南通医学院附属医院消化内科 江苏省南通市 226001  
李兆申,许国铭,中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科  
上海市 200433  
项目负责人:周国雄,226001,江苏省南通市西寺路20号,南通医学院附属医院  
消化内科. zhoughuoxiong@pub.nt.jsinfo.net  
收稿日期:2002-04-04 接受日期:2002-08-16

## 摘要

胰腺癌的早期诊断相当困难,众多的研究已证实 K-ras 12 密码子点突变与胰腺癌相关性最好.选择敏感的检测方法检测多种途径获取的标本中 K-ras12 密码子点突变,为胰腺癌的早期诊断提供了可能.本文综述了近年来由胰腺细针穿刺(FNA)、胰液、十二指肠液、外周血和粪便等获取的标本中 K-ras12 密码子点突变的检测及对胰腺癌早期诊断的价值.

周国雄,李兆申,许国铭.K-ras 12 密码子点突变在胰腺癌早期诊断中的意义.  
世界华人消化杂志 2003;11(1):74-77  
<http://www.wjnet.com/1009-3079/11/74.htm>

## 0 引言

胰腺癌的发病率在国内外均逐年升高,但由于解剖位置关系以及缺乏特异有效的检查手段,胰腺癌的早期诊断仍相当困难.然而,许多近期研究已显示出分子生物学特征在胰腺癌发生发展中起着重要作用,其中 K-ras12 密码子点突变见于 90% 左右的胰腺癌,远远高于在其他肿瘤的突变发生率<sup>[1-8]</sup>.采用 PCR 和直接测序法分析由胰腺细针穿刺(FNA)、胰液、十二指肠液、外周血和粪便等获取的标本中 K-ras12 密码子点突变,为胰腺癌的早期诊断提供了可能.本文综述了胰腺癌中 K-ras12 密码子点突变的临床意义.

## 1 ras 基因结构、功能及其与肿瘤的关系

ras 基因是人体肿瘤中常见的致癌基因,ras 基因家族由 K-ras、H-ras 和 N-ras 组成,其转变为活动性致癌基因的主要部位是第 12、13 和 61 密码子的突变,K-ras 基因激活在胰腺癌的发生中已有肯定的研究,其中以 K-ras12 密码子点突变最常见.ras 基因家族的成员相互间同源性可达 85%,ras 基因编码的蛋白质是 P<sup>21</sup> 蛋白,分子量为 21KD,由 188-189 个氨基酸组成,称之为 P<sup>21</sup> 高度相关蛋白,位于细胞膜的内表面,参与传导细胞增生信号的调控系统.P<sup>21</sup> 是一个 GTP 结合蛋白,影响细胞中信号传递.ras 基因突变时,在 GTPase 的作用下,GTP-P<sup>21</sup> 转化成 GDP-P<sup>21</sup> 被阻滞,导致活化型 GTP-P<sup>21</sup> 增加和持续信号传递.因此,P<sup>21</sup> 直接或间接增强或抑制许多其他基因<sup>[9]</sup>.

K-ras 基因的突变率在不同的肿瘤组织中并不相同,Bos et al<sup>[10]</sup>分析了人体肿瘤中 K-ras 基因点突变的发生率,胰腺癌 82%,结肠癌 43%,肺癌 30%,甲状腺癌 29%,膀胱、肝、肾和子宫癌 10% 或低于 10%.可见 K-ras 点突变仅在胰腺癌中发生率最高.进一步研究胰胆管系统中 K-ras 点突变的发生率,其中胰腺癌 88%,低位胆管癌 47%,壶腹癌 19%,高位胆管癌 9%,中位胆管癌 0%<sup>[11]</sup>.

K-ras 点突变检测的方法有:寡聚核苷酸探针杂交法<sup>[12]</sup>(allele-specific oligonucleotide hybridization, PCR-ASO),DNA 直接测序法<sup>[13]</sup>(PCR-direct sequencing,PCR-DSM),单链构像多态性分析法<sup>[14]</sup>(single strand conformation polymorphism,PCR-SSCP),限制性片段长度多态性分析法<sup>[15,16]</sup>(restriction fragment length polymorphism,PCR-RFLP),杂交保护分析法<sup>[17,18]</sup>(hybridization protection assay,PCR-HPA).各种检测方法其敏感性变化较大,肿瘤细胞标本取样不同也影响其检测突变率,且突变率随着标本中正常细胞和间质细胞增加而降低.因此,测定出的 K-ras 点突变率与其使用的检测方法有一定关系.

## 2 K-ras 基因在胰腺癌中突变及其对早期诊断的价值

2.1 胰腺组织中 K-ras 基因点突变 1988 年 Almqvister et al<sup>[19]</sup>首先发现胰腺癌中存在 K-ras 基因点突变,其突变率为 95%(21/22),这一报道引起极大注意.随后众多学者对其进行了广泛研究.Kimura et al<sup>[9]</sup>最近复习了 30 份文献,发现胰腺癌 K-ras 基因点突变率为 70-100%,平均为 80.5%(560/696),尽管检测方法不一,大部分为甲醛固定石蜡包埋组织,部分为冰冻组织,但这些研究已充分表明胰腺癌中 K-ras 基因点突变率要高于其他肿瘤.

产黏蛋白的胰腺肿瘤(mucin-producing tumor,MPT)是发生于胰管内的分泌大量黏液的乳头状肿瘤,被认为是低度恶性肿瘤.Satoh et al<sup>[20]</sup>报道产黏蛋白的胰腺肿瘤 K-ras 点突变率为 55%(11/20),并随上皮不典型增生的程度而增加.Hoshi et al<sup>[21]</sup>报道其 K-ras 点突变率为 100%,由此认为 K-ras 点突变是产黏蛋白的胰腺肿瘤重要的生物学特征.有研究报道发现胰腺导管内乳头状肿瘤 K-ras 点突变率为 60%(3/5),其突变率与细胞不典型增生的程度无关,而与肿瘤的大小有关<sup>[22]</sup>.Yanagisawa et al<sup>[23]</sup>也发现,3/5 例腺瘤和 2/3 例腺癌获阳性结果,在同时存在腺瘤的腺癌标本中其突变方式是一样的.值得

注意的是有研究表明在胰腺增生上皮中K-ras点突变率可达24%(19/74),显示K-ras点突变不仅出现在胰腺癌中,也可见于胰腺癌形成之前的胰腺增生上皮中<sup>[24]</sup>.因此认为这些病灶可能为癌前期病变,而K-ras点突变是胰腺癌发生的早期事件.更有学者报道1例经手术证实的胰腺癌患者,3 a前ERCP仅显示主胰管极轻度狭窄而不足以诊断为胰腺癌,但胰液中已检测到胰液K-ras12密码子点突变,因此胰液K-ras12密码子点突变早于影像学表现<sup>[25]</sup>.

B超、CT或超声内镜引导下经皮细针穿刺(FNA)细胞学已在临床普遍开展,但对胰腺小病灶其诊断价值有限.临床上对疑有胰腺癌患者经皮细针穿刺检测K-ras12密码子点突变可进一步提高其诊断正确率.Evans et al<sup>[26]</sup>对25例可疑胰腺病灶经皮细针穿刺行K-ras12密码子点突变检测其中21例有K-ras点突变.Ihalainen et al<sup>[27]</sup>检测了21例可疑胰腺疾病FNA穿刺标本,K-ras点突变率为82%(14/17),常规细胞学阳性率为78%.Pinto et al<sup>[28]</sup>研究发现FNA细胞学诊断敏感性为76%,K-ras12密码子点突变检测则为82%,而细胞学加上K-ras12密码子点突变检测其诊断敏感性可提高至94%,提示K-ras12密码子点突变分析可增强胰腺癌FNA细胞学诊断敏感性.

## 2.2 胰管脱落上皮细胞 K-ras 基因点突变

### 2.2.1 胰液及胰管刷取液中 K-ras 基因点突变

90%以上胰腺肿瘤多起源于胰管上皮,故有可能在胰液中找到脱落的肿瘤细胞或癌前期病变,应用K-ras基因点突变检测提高肿瘤诊断的敏感性.1993年Tada et al<sup>[29]</sup>首先在6例胰腺癌的胰液中检测K-ras点突变均获阳性结果,从而为胰腺癌的早期诊断带来了希望.有人总结了11份文献,导管细胞癌胰液中K-ras点突变率为50-100%,平均突变率为72%(98/137),产粘蛋白胰腺肿瘤突变率为53%(8/15).最近有学者分析了12例胰管导管内乳头状产粘蛋白肿瘤(intraductal papillary mucinous tumors IPMT),包括8例腺癌和4例腺瘤,其胰液中K-ras点突变率为100%<sup>[30]</sup>.Van Laethem et al<sup>[31]</sup>采用PCR-RFLP和直接测序法分析胰管刷检标本K-ras12密码子点突变并与常规细胞学检查进行比较,结果胰腺癌K-ras12密码子点突变率为83%,常规细胞学阳性率为54%,K-ras基因突变敏感性、特异性、准确性分别为83%、100%、90%,而常规细胞学则为76%、83%、58%.Ochi et al<sup>[32]</sup>还报道1例患者,ERP细胞学检查阴性,B超和CT检查也无异常发现,而K-ras12密码子点突变阳性,随访18 mo后发现主胰管狭窄,手术证实为12 mm的胰腺癌.这为基因检测诊断小胰癌提供了一个有趣的线索.Boadas et al<sup>[33]</sup>报道胰腺癌胰液中K-ras突变率为44%,其中1例为早期胰腺癌,慢性胰腺炎胰液中K-ras突变率为16%,其中有1例后发展为胰腺癌.Queneau et al<sup>[34]</sup>也报道慢性胰腺炎胰液中K-ras突变率为27.8%(10/36),其

中有2例在分别在随访7和17 mo后诊断为胰腺癌.但是检测到K-ras12密码子点突变是否意味着就是肿瘤和恶性病灶的存在仍有不同看法.Furuya et al<sup>[35]</sup>分析了慢性胰腺炎胰液中K-ras12密码子点突变,其阳性率为37%(20/57),突变类型为GAT 7例,GTT 11例,TGT 2例,随访78 mo,无1例发展为胰腺癌,故认为胰液中K-ras12密码子点突变检测对胰腺癌的诊断与鉴别诊断作用不大.因而Kimura et al<sup>[9]</sup>提出:(1)应当分析胰液中K-ras12密码子点突变的氨基酸序列;(2)联合检测胰液中其他参数如肿瘤标记物;(3)同时检测其他标本的K-ras12密码子点突变.Tada et al<sup>[22]</sup>发现在胰腺癌和增生病灶中K-ras基因从GGT(甘氨酸)突变成GAT(天门冬氨酸)GTT(缬氨酸)和CGT(精氨酸),在增生病灶中仅突变成TGT(半胱氨酸)或AGT(丝氨酸),这些发现提示在胰液中检测K-ras点突变氨基酸序列可提供更为精确的诊断,而不仅仅是检测他的存在.联合检测胰液K-ras点突变与端粒酶活性及肿瘤标记物也可提供更为精确的诊断,胰液中CEA在鉴别胰腺良、恶性病灶是有价值的,其分界值为50 ng/ml,检测胰液中P53突变也可能是诊断胰腺癌一个有用的工具<sup>[36-41]</sup>.

### 2.2.2 十二指肠液中 K-ras 基因点突变

由于胰液收集较为困难,而十二指肠液标本的收集相对简单安全.有人采用富集PCR-SSCP法分析了十二指肠液中K-ras12密码子点突变,阳性率63%(12/19),包括10例导管腺癌,2例导管内乳头状腺癌.突变类型包括GAT(4例)、GTT(3例)、CGT(1例)、GTT和GAT双突变(3例)、GAT和CGT(1例),4例良性胰腺疾病中,仅1例慢性胰腺炎检测到其突变.Wilentz et al<sup>[42]</sup>研究发现,61例胰腺良、恶性病变患者中有7例其十二指肠液标本中DNA不扩增,13份标本(占十二指肠液标本里有DNA扩增54份的24%,并占总数61份标本的21%)中在K-ras基因12密码子有激活突变的位点,9例胰腺良性疾病十二指肠液标本里有DNA扩增现象,但从中未检出1份基因突变(特异性100%).最近,Nakamura et al<sup>[43]</sup>进一步研究了胰腺癌十二指肠灌洗液(duodenal lavage fluid DLF)中K-ras12密码子点突变的诊断价值,将ERCP术前收集的十二指肠灌洗液定为DLF<sub>1</sub>,术后收集的定为DLF<sub>2</sub>,并与纯胰液(PPJ)进行比较,结果发现DLF<sub>1</sub>中K-ras12密码子点突变率为60.9%(14/23),DLF<sub>2</sub>中为76.2%,PPJ中为70.0%(14/20),在非癌性胰腺疾病中DLF<sub>1</sub>为9.5%(2/21),DLF<sub>2</sub>为36.8%(7/19),提示十二指肠灌洗液可提供一个新的有用的标本供分析K-ras12密码子点突变.有望成为胰腺癌早期诊断新方法的基础,值得进一步研究.

### 2.2.3 粪标本中 K-ras 基因点突变

早期研究发现在胰腺癌粪便标本中检测到K-ras12密码子点突变,他们认为粪便标本中K-ras点突变来源于胰腺癌或胰腺增生上皮经胰液排入肠腔,是筛选胰腺癌的有效方法.但有

文献报道也可以在结直肠癌粪便标本中检测到K-ras12密码子点突变<sup>[44]</sup>。Caldas et al<sup>[45]</sup>报道胰腺癌患者粪便标本中K-ras12密码子点突变率54.5%(6/11),慢性胰腺炎为33.3%(1/3),Berndt et al<sup>[46]</sup>报道胰腺癌和慢性胰腺炎患者粪便标本中K-ras点突变率分别为40%(10/25),33%(2/6)。最近,Wenger et al<sup>[47]</sup>也分析了胰腺疾病粪便标本中K-ras点突变,结果导管癌阳性率为20%(7/36),慢性胰腺炎为40%(2/5),敏感性仅为20%。最近国内有文献报道粪便标本中K-ras点突变率88.0%(66/75),胰腺良性病变为51.1%(24/47)<sup>[48]</sup>。因此,粪便标本中K-ras点突变检测对鉴别胰腺癌与慢性胰腺炎价值有限,其特异性仍有待于进一步研究。

2.3 外周血中K-ras基因点突变 近年来研究证实,在正常人的血浆中存在极微量的DNA,其浓度大约10 ng/ml,而肿瘤患者血浆DNA浓度常常超过100 ng/ml,这种DNA来源于恶性肿瘤细胞,其中胰腺癌患者血浆DNA含量高达650 ng/ml,有可能通过敏感的PCR方法检测到其中突变的K-ras基因。有报告用PCR法分析了15例胰腺癌K-ras12密码子点突变,其中6例阳性,术后持续阳性预后差,4例慢性胰腺炎和5例正常对照均为阴性<sup>[49]</sup>。Mulcahy et al<sup>[50]</sup>进一步采用简单、快速的DNA提取技术从外周血中提取DNA,应用两步PCR-RFLP法分析胰腺癌K-ras12密码子点突变,阳性率为81%(17/21),其突变方式与肿瘤组织中K-ras突变方式一致,其中4例在临床诊断为胰腺癌5-14 mo之前就检测到K-ras突变,而2例慢性胰腺炎和5名健康对照无1名阳性。表明这是一种较敏感的方法,而且标本易于获得,极大地促进了K-ras12密码子点突变检测的临床应用,有助于提高胰腺癌术前定性诊断水平,但由于血浆DNA含量很少,高敏感的DNA提取技术和K-ras突变检测方法将成为今后研究的方向。

总之,早期发现、早期诊断、早期治疗是提高胰腺癌诊治水平的关键,目前影像诊断及血清肿瘤标记物对胰腺癌早期诊断仍令人失望,胰腺肿块术前定性尚无良策,而众多的研究已证实K-ras12密码子点突变对胰腺癌早期诊断具有较高的价值,但目前报道均限于回顾性分析,缺乏前瞻性的研究。同时在胰腺非恶性疾病中也存在K-ras12密码子的点突变,是否属癌前病变仍有待于进一步研究。因此,进一步探索高敏感的检测方法和选择多种标本联合检测可望提高胰腺癌早期诊断水平。

### 3 参考文献

- 1 徐选福,王兴鹏.胰腺癌诊断新认识.世界华人消化杂志 2000;8:1034-1036
- 2 刘江伟,李开宗.胰腺癌与癌基因及抑癌基因.世界华人消化杂志 2001;9:72-73
- 3 孙诚谊,张延龄,施达仁,陆洪珍.胰腺癌ras癌基因及p53抑癌基因表达的临床意义.世界华人消化杂志 1998;6(特刊7):237-239
- 4 Liu XL,Dai CC, miao Y,Du JH,Zhang ZS,Chen SZ.Detection of K-ras gene point mutation in fine needle aspiration and pancre-

- atic juice by sequence special primer method and its clinical significance. *World J Gastroenterol* 2000;6:917-919
- 5 徐永泉,刘香,夏玉亭.胰腺癌组织c-Ki-ras基因点突变分析.世界华人消化杂志 2001;9:1329-1330
- 6 陈建锋,俞金龙,汪爽,高毅.胰腺癌组织p16蛋白表达的意义.世界华人消化杂志 2001;9:237
- 7 周国雄,李兆申,许国铭,屠振兴.胰腺癌DPC4/Smad4基因突变及表达.世界华人消化杂志 2002;10:328-332
- 8 Guo XZ, Friess H,Shao XD,Liu MP,Xia YT,Xu JH,Buchler MW. KALL gene is differently expressed in papillary and pancreatic cancer:influence on metastasis. *World J Gastroenterol* 2000;6:866-871
- 9 Kimura W,Zhao B,Futakawa N,Muto T,Makuuchi M.Significance of K-ras codon 12 point mutation in pancreatic juice in the diagnosis of carcinoma of the pancreas. *Hepato Gastroenterol* 1999;46:532-539
- 10 Bos JL.Ras oncogenes in human cancer:a review. *Cancer Res* 1989;49:4682-4689
- 11 Motojima K,Tsunoda T,Kanematsu T,Negata Y,Urano T,Shiku H.Distinguishing pancreatic carcinoma from other periampullary carcinomas by analysis of mutations in the Kirsten-ras oncogene. *Ann Surg* 1991;214:657-662
- 12 Nagata Y,Abe M,Motoshima K,Nakayama E,Shiku H.Frequent glycine-to-aspartic acid mutations at codon 12 of C-Ki-ras gene in pancreatic cancer in Japanese. *Jpn J Cancer Res* 1990;81:135-140
- 13 Tada M,Omata M,Ohto M.Clinical application of ras gene mutation for diagnosis of pancreatic adenocarcinoma. *Gastroenterology* 1991;100:233-238
- 14 Iguchi H,Sugano K,Fukayama N,Ohkura H,Sadamoto K,Ohkoshi K,Seo Y,Tomodai H,Funakoshi A,Wakasugi H.Analysis of K-ras codon 12 mutations in the duodenal juice of patients with pancreatic cancer. *Gastroenterology* 1996;110:221-226
- 15 Watanabe H,Sawabu N,Songur Y,Yamaguchi Y,Yamakawa O,Satomura Y,Ohta H,Motoo Y,Okai T,Wakabayashi T.Detection of K-ras point mutation at codon 12 in pure pancreatic juice for diagnosis of pancreatic cancer by PCR-RFLP analysis. *Pancreas* 1996;12:18-24
- 16 Berthelemy P,Bonisson M,Escourrou J,Vaysse N,Rumeau JL,Pradayrol L.Identification of K-ras mutation in pancreatic juice in the early diagnosis of pancreatic cancer. *Ann Intern Med* 1995;123:188-191
- 17 Watanabe H,Miyagi C,Yamaguchi Y,Satomura Y,Ohta H,Motoo Y,Okai T,Yoshimura T,Tsuji Y,Sawabu N.Detection of K-ras point mutation at codon 12 in pancreatic juice for the diagnosis of pancreatic cancer by hybridization protection assay:A simple method for determination of the type of point mutation. *Jpn J Cancer Res* 1996;87:466-474
- 18 Watanabe H,Yamaguchi Y,Ha A,Hu YX,Motoo Y,Okai T,Yoshimura T,Sawabu N.Quantitative determination of K-ras mutations in pancreatic juice for diagnosis of pancreatic cancer using hybridization protection assay. *Pancreas* 1998;17:341-347
- 19 Almoguera C,Shibats D,Forrester K,Martin J,Arnheim N,Perucho M.Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 1988;53:549-554
- 20 Satoh K,Sawai AW T,Shimosegawa T,Koizumi M,Yamazaki T,Mochizuki F,Toyota T.The point mutation of c-K-ras at codon 12 in carcinoma of the pancreatic head region and in intraductal mucin-hypersecreting neoplasm of the pancreas. *Int J Pancreatol* 1993;14:135-143
- 21 Hoshi T,Imai M,Ogawa K.Frequent K-ras mutations and absence of P<sup>53</sup> mutations in mucin-producing tumor of the pancreas. *J Surg Oncol* 1994;55:84-91
- 22 Tada M,Omata M,Oto M.Ras gene mutations in intraductal papillary neoplasms of the pancreas. *Cancer* 1991;67:634-637
- 23 Yanagisawa A,Kato Y,Ohtake K,Kitagawa T,Ohashi K,Hori M,Takagi K,Sugano H.c-Ki-ras point mutations in duct ectatic-type mucinous cystic neoplasms of pancreas. *Jpn J Cancer Res* 1991;82:1057-1060
- 24 Tada M, Ohashi M,Shiratori Y,Okudaira T,Komatsu Y,Kawabe T,Yoshida H,Machinami R,Kishi K,Omata M.Analysis of K-ras gene mutation in hyperplastic duct cells of the pancreas without pancreatic disease. *Gastroenterology* 1996;110:227-231
- 25 Wakabayashi T,Sawabu N,Watanabe H,Morimoto H,Sugioka

- G, Takita Y. Detection of K-ras point mutation at codon 12 in pure pancreatic juice collected 3 years and 6 months before the clinical diagnosis of pancreatic cancer. *Am J Gastroenterol* 1996; 91:1848-1851
- 26 Evans DB, Frazier ML, Charnsangavej C, Katz RL, Larry L, Abbruzzese JL. Molecular diagnosis of exocrine pancreatic cancer using a percutaneous technique. *Ann Surg Oncol* 1996;3: 241-246
- 27 Ihalainen J, Taavitsainen M, Salmivaara T, Palotie A. Diagnosis of pancreatic lesions using fine needle aspiration cytology: Detection of K-ras point mutations using solid phase minisequencing. *J Clin Pathol* 1994;47:1082-1084
- 28 Pinto MM, Emanuel JR, Chaturvedi V, Costa J. Ki-ras mutations and the carcinoembryonic antigen level in fine needle aspirates of the pancreas. *Acta Cytol* 1997;41:427-434
- 29 Tada M, Omata M, Kawai S, Saisho H, Ohto M, Saiki RK, Sninsky JJ. Detection of ras gene mutations in pancreatic juice and peripheral blood of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 1993;53:2472-2474
- 30 Kaino M, Kondoh S, Okita S, Hatano S, Shiraishi K, Kaino S, Okita K. Detection of K-ras and P53 gene mutations in pancreatic juice for the diagnosis of intraductal papillary mucinous tumors. *Pancreas* 1999;18:294-299
- 31 Van Laethem JL, Vertongen P, Deviere J, Van Rampelberg J, Rickaert M, Cremer M, Robberecht P. Detection of c-Ki-ras gene codon 12 mutations from pancreatic duct brushings in the diagnosis of pancreatic tumours. *Gut* 1995;36:781-787
- 32 Ochi K, Hasuoka H, Mizushima Y, Matsumura N, Harada H. A case of small pancreatic diagnosed by serial follow-up studies promptly by a positive K-ras point mutation in pure pancreatic juice. *Am J Gastroenterol* 1998;93:1366-1368
- 33 Boadas J, Mora J, Urgell E, Puig P, Roca M, Cusso X, Capella G, Lluís F, Farre A. Clinical usefulness of K-ras gene mutation detection and cytology in pancreatic juice in the diagnosis and screening of pancreatic cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:1153-1159
- 34 Queneau PE, Adessi GL, Thibault P, Cleau D, Heyd B, Manton G, Carayon P. Early detection of pancreatic cancer in patients with chronic pancreatitis: diagnostic utility of a k-ras point mutation in the pancreatic juice. *Am J Gastroenterol* 2001;96:700-704
- 35 Furuya N, Kawa S, Akamatsu T, Furihata K. Long-term follow-up of patients with chronic pancreatitis and K-ras gene mutation detected in pancreatic juice. *Gastroenterology* 1997;113:593-598
- 36 Myung SJ, Kim MH, Kim YS, Kim HJ, Park ET, Yoo KS, Lim BC, Wan Seo D, Lee SK, Min YI, Kim JY. Telomerase activity in pure pancreatic juice for the diagnosis of pancreatic cancer may be complementary to K-ras Mutation. *Gastrointest Endosc* 2000;51:708-713
- 37 Uehara H, Nakaizumi A, Tatsuta M, Baba M, Takenaka A, Uedo N, Sakai N, Yano H, Iishi H, Ohigashi H, Ishikawa O, Okada S, Kakizoe T. Diagnosis of pancreatic cancer by detecting telomerase activity in pancreatic juice: Compare with K-ras mutations. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2513-2518
- 38 Urgell E, Puig P, Boadas J, Capella G, Queralto JM, Boluda R, Antonijuan A, Parre A, Lluís F, Gonzalez-Sastre F, Mora J. Prospective evaluation of the contribution of K-ras mutational analysis and CA19-9 measurement to cytological diagnosis in patients with clinical suspicion of pancreatic cancer. *Eur J Cancer* 2000; 36:2069-2075
- 39 Futakawa N, Kimura W, Yamagata S, Zhao B, Ilsoo H, Inoue T, Sata N, Kawaguchi Y, Kubota Y, Muto T. Significance of K-ras mutation and CEA level in pancreatic juice in the diagnosis of pancreatic cancer. *J Hepatobil Pancreat Surg* 2000;7:63-71
- 40 Usui H, Otani T. Detection of K-ras and p53 gene mutation in pancreatic juice for the of intraductal papillary mucinous tumors. *Pancreas* 2001;22:108-109
- 41 Yamaguchi Y, Watanabe H, Yrdiran S, Ohtsubo K, Motoo Y, Okai T, Sawabu N. Detection of mutations of p53 tumor suppressor gene in pancreatic juice and its application to diagnosis of patients with pancreatic cancer: comparison with k-ras mutation. *Clin Cancer Res* 1999;5:1147-1153
- 42 Wilentz R, Chung CH, Sturm PDJ, Musler A, Sohn TA, Offerhaus GJ, Yeo CJ, Hruban RH, Slebos RJ. K-ras mutations in the duodenal fluid of patients with pancreatic carcinoma. *Cancer* 1998;82: 96-103
- 43 Nakamura Y, Onda M, Uchida E. Analysis of K-ras codon 12 point mutations using duodenal lavage fluid for diagnosis of pancreatic carcinoma. *Pancreas* 1999;18:133-140
- 44 Doolittle BR, Emanuel J, Tuttle C, Costa J. Detection of the mutated K-Ras biomarker in colorectal carcinoma. *Exp Mol Pathol* 2001;70:289-301
- 45 Caldas C, Hahn SA, Hruban RH, Redston MS, Yeo CJ, Kern SE. Detection of K-ras mutations in the stool of patients with pancreatic adenocarcinoma and pancreatic ductal hyperplasia. *Cancer Res* 1994;54:3568-3573
- 46 Berndt C, Haubold K, Wenger F, Brux B, Muller J, Bendzko P, Hillebrand T, Kottgen E, Zanow J. K-ras mutations in stools and tissue samples from patients with malignant and nonmalignant pancreatic diseases. *Clin Chem* 1998;44:2103-2107
- 47 Wenger FA, Zieren J, Peter FJ. K-ras mutations in tissue and stool samples from patients with pancreatic cancer and chronic pancreatitis. *Langenbecks Arch Surg* 1999;384:181-186
- 48 陆星华, 徐彤, 钱家鸣, 陈元方, 温小恒, 伍东升. 检测胰液和粪便中 k-ras 和 p53 基因突变对胰腺癌早期诊断的价值. *中华医学杂志* 2001; 81:1050-1053
- 49 Yamada T, Nakamori S, Ohzato H, Oshima S, Aoki T, Higaki N, Sugimoto K, Akagi K, Fujiwara Y, Nishisho I, Sakon M, Gotoh M, Monden M. Detection of K-ras gene mutations in plasma DNA of patients with pancreatic adenocarcinoma: correlation with clinicopathological features. *Clin Cancer Res* 1998;4:1527-1532
- 50 Mulcahy HE, Lyautey J, Lederrey C, Chen X, Anker P, Alstead EM, Ballinger A, Farthing MJ, Stroun M. A prospective study of K-ras mutations in the plasma of pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res* 1998;4:271-275