

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.12.005

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.12.005

胰腺导管腺癌患者 *KRAS* 与 *SMAD4* 基因的突变情况

李永星¹, 邢晓明¹, 李胜勇², 王丽丽¹, 李广起¹, 宋琳³, 杨平⁴

(1. 青岛大学附属医院病理科, 山东 青岛 266000; 2. 威海市立医院病理科, 山东 威海 264200;
3. 山东省立医院病理科, 济南 250000; 4. 毓璜顶医院病理科, 山东 烟台 264006)

[摘要] 目的: 研究胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC)患者*KRAS*与*SMAD4*(也称*DPC4*)基因的突变情况, 并探讨两者与PDAC患者临床病理特征的相关性。方法: 收集50例未经放化疗的PDAC患者的肿瘤石蜡标本, 通过Sanger测序法检测*KRAS*基因2号外显子与*SMAD4*基因全外显子的突变情况, 并分析突变与临床病理特征之间的关系。结果: *KRAS*基因2号外显子突变率为72% (36/50), 其中35例患者发生第12密码子错义突变(p.Gly12Asp 23例, p.Gly12Arg 2例, p.Gly12Val 8例, p.Gly12Cys 2例), 1例患者同时发生第6密码子错义突变c.16C>T [p.(Leu6Phe)]和第23密码子同义突变(c.67C>T)。 *KRAS*基因突变与肿瘤分期($P<0.01$)、分化程度低($P<0.05$)及淋巴结转移($P<0.01$)相关。未检测出*SMAD4*外显子有突变。结论: *KRAS*基因与山东地区PDAC患者恶性程度高、预后差相关。*SMAD4*突变在本地区PDAC患者中较为罕见, 提示*SMAD4*突变存在地区差异性。

[关键词] 胰腺导管腺癌; *SMAD4/DPC4*; *KRAS*; 突变

KRAS and *SMAD4* gene mutations in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma

LI Yongxing¹, XING Xiaoming¹, LI Shengyong², WANG Lili¹, LI Guangqi¹, SONG Lin³, YANG Ping⁴

(1. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong 266000; 2. Department of Pathology, Weihai Municipal Hospital, Weihai Shandong 264200; 3. Department of Pathology, Provincial Hospital of Shandong, Ji'nan 250000;
4. Department of Pathology, Yuhuangding Hospital, Yantai Shandong 264006, China)

Abstract **Objective:** To investigate the mutations of *KRAS* and *SMAD4* (*DPC4*) genes and to determine the relationship between the gene mutations and clinicopathological characteristics in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) in Shandong Province. **Methods:** Fifty paraffin-embedded tissues from patients with PDAC without radiotherapy and chemotherapy were enrolled in this study. The *KRAS* gene exon 2 and the whole exons of *SMAD4* gene were sequenced by Sanger sequencing. The relationship between mutations and clinicopathological features was analyzed. **Results:** The mutation rate of *KRAS* gene exon 2 was 72% (36/50), including 35 cases with mutations at codon 12 (p.Gly12Asp 23 cases, p.Gly12Arg 2 cases, p.Gly12Val 8 cases, p.Gly12Cys 2 cases), and 1 case with mutations at codon 6 c.16C>T [p.(Leu6Phe)] and codon 23 (c.67C>T). The *KRAS* mutations were associated with tumor stage ($P<0.01$), poor differentiation ($P<0.05$) and lymph node metastasis ($P<0.01$). No mutation in the whole

收稿日期 (Date of reception): 2017-09-29

通信作者 (Corresponding author): 邢晓明, Email: edithxing@126.com

exons of *SMAD4* gene was detected in this study. **Conclusion:** The mutation of *KRAS* gene is significantly associated with malignancy and poor prognosis in patients with PDAC in Shandong Province. *SMAD4* mutation is rarely detected in these patients, which indicates possible geographic discrepancy of *SMAD4* gene mutation.

Keywords pancreatic ductal adenocarcinoma; *SMAD4/DPC4*; *KRAS*; mutation

胰腺癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一, 其中胰腺导管腺癌 (pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC) 占 90%, 在我国发病率呈逐年上升趋势, 近 20 年来发病率升高近 6 倍^[1], 占因癌症死亡的前 10 位^[2]。在胰腺癌中 *KRAS* 原癌基因和 *SMAD4* 抑癌基因存在高频率突变^[3-6]。*KRAS* 原癌基因激活是胰腺癌发生与发展的主要驱动力^[7]。*SMAD4* 也称 *DPC4*, 其表达缺失能够加速 *KRAS* 突变体 *KRAS G12D* 所引发的癌前病变的恶性进程, 加速胰腺恶性肿瘤的形成^[8-9]。本研究通过对 50 例 PDAC 患者 *KRAS* 基因 2 号外显子和 *SMAD4* 基因全外显子进行 Sanger 测序, 分析山东地区 PDAC 患者 *KRAS* 与 *SMAD4* 基因突变情况及与临床病理特征间的联系。

1 对象与方法

1.1 对象

收集中国山东地区 50 例原发性 PDAC 汉族患者的肿瘤石蜡标本, 其中女 22 例, 男 28 例。年龄 40~75(59.6±8.5) 岁。标本来自青岛大学附属医院病理科和山东省立医院病理科。入选标准: 1) 病理学确诊为胰腺导管癌的患者; 2) 术前未接受过放化疗; 3) 肿瘤组织占组织总面

积的 60% 以上。病理分期采用美国肿瘤联合会 (AJCC) 第八版 TNM 标准。IA 期、IB 期各 15 例, IIA 期 3 例, IIB 期 9 例, III 期 2 例, IV 期 6 例。该研究获得青岛大学附属医院、山东省立医院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取

切取厚度为 5~10 μm 石蜡切片 5~8 张, 使用天根石蜡包埋组织 DNA 提取试剂盒 (天根生化科技有限公司) 提取全基因组 DNA, -20 °C 保存。

1.2.2 PCR 扩增与扩增产物测序

PCR 反应体系 (20 μL): 2×PowerTaq PCR Master Mix [1×reaction buffer (10 mmol/L Tris HCl, pH 8.3, 50 mmol/L KCl, 2.5 mmol/L MgCl₂), 200 nmol/L dNTPs, 1.25 U TaqDNA 聚合酶] 10 μL, 上下游引物 (10 pmol/μL) 各 0.5 μL, DNA 模板 (20~80 ng/μL) 2 μL, 灭菌双蒸水 7 μL。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 54~60 °C 1 min, 72 °C 45 s 共 35 个循环; 72 °C 10 min (表 1)。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 条带单一清晰, 由青岛擎科梓熙生物技术有限公司进行 Sanger 测序。测序结果通过 BioEdit 软件与 DNAMAN 软件进行分析。

表1 *SMAD4*基因全外显子与*KRAS*基因2号外显子引物

Table 1 Whole exons of *SMAD4* gene and exon 2 of *KRAS* gene primers

外显子	上游引物 (5' → 3')	下游引物 (5' → 3')	片段长度 /bp	退火温度 /°C
SMAD4-1	CCTGATAGCCATGGGTGAGT	GCTTGAAAGGAAACGTAGCAAGTT	558	56
SMAD4-2	TGGTAGGATGTGAGGATTAATCAG	CGCGGGCTATCTTCCAAAT	368	56
SMAD4-3	TGATAITTTGCCCTTTAGAACAT	TGCCGCTCACACAACTAATTC	350	60
SMAD4-4	GTTTATCAAGAACTGAGGAGTACCTTTT	TGCCGCTCACACAACTAATTC	600	58
SMAD4-5	CCTGATAGCCATGGGTGAGT	TAAGGCCACATGGGTTAAITTT	350	58
SMAD4-6	AAGGACTGTTGCAGATAGCATCAG	ACAGAAAACAAAGCCCTACCAAAA	361	54
SMAD4-7	CTTGGCAGATAGCACTGAAATGTTAG	AAAGCCTGTGTTTGTGCGTTT	350	56
SMAD4-8	TCCCCTCCCTTTACCTTTTCT	GATGGAGTGCITACAAATGTT	450	59
SMAD4-9	ACATGCTCCTGACACATAGTAAGTGTT	CCCAGATTTCAAATCTTTTGACAA	462	58
SMAD4-10	TGAGITTTAAATAAGTCAGGCATTGG	TTCAAAAATGTCATCATCCCAGTAA	358	58
SMAD4-11	CCTTAACCAAAAGTGTGCAGCTT	TTGTAGTCCACCATCCTGATAAGGT	450	56
KRAS-2	AAAGGTACTGGTGGAGTAAITTGATAGTG	TTCAAAAATGTCATCATCCCAGTAA	405	59

1.3 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件对基因突变与临床病理特征的关系进行 χ^2 检验。P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PCR 结果

SMAD4 基因全外显子与 KRAS 基因 2 号外显子 PCR 产物均为单一清晰的条带, 随后进行 Sanger 测序(图1)。

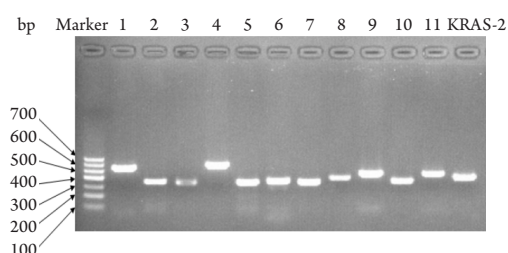


图 1 SMAD4 基因 1~11 号外显子与 KRAS 基因 2 号外显子 PCR 产物电泳结果

Figure 1 Electrophoresis results of SMAD4 gene 1-11 exons and 2 exon of KRAS gene PCR products

从左至右依次为 Marker, SMAD4 基因第 1~11 号外显子及 KRAS 基因 2 号外显子。

From left to right: Marker, SMAD4 gene exons 1-11 and exon 2 of KRAS gene.

2.2 KRAS 基因 2 号外显子突变情况及其与 PDAC 临床病理特征的联系

50 例 PDAC 标本中, KRAS 基因第 2 号外显子突变率为 72% (36/50), 其中 35 例发生第 12 密码子的错义突变, 1 例同时发生第 6 密码子错义突变 c.16C>T [p.(Leu6Phe)] 与第 23 密码子的同义突变 c.67C>T (p.Leu23=)。第 12 密码子的突变类型包括 23 例 c.35G>A (p.Gly12Asp), 2 例 c.34G>C (p.Gly12Arg), 8 例 c.35G>T (p.Gly12Val8), 2 例 c.34G>T (p.Gly12Cys), 未见第 13 密码子突变(表 2, 图 2)。IIB 期与 III-IV 期患者 KRAS 突变率高于 IIA 期患者, I 期患者突变率最低 (P<0.01)。分化程度越低 KRAS 突变率越高 (P<0.05), 有淋巴结转移患者 KRAS 基因突变率

高于无淋巴结转移患者 (P<0.01)。性别、年龄、肿瘤发生部位与 KRAS 基因突变差异均无统计学意义 (均 P<0.05, 表 3)。

2.3 SMAD4 基因突变情况

对 SMAD4 全外显子进行 Sanger 测序, 未检测出突变。

表 2 KRAS 基因的突变情况

Table 2 Mutations in KRAS gene

密码子	氨基酸改变	碱基突变位点	百分比 / %
6	p.Leu6Phe	c.16C>T	2.70
12	p.Gly12Asp	c.35G>A	62.20
12	p.Gly12Arg	c.34G>C	5.40
12	p.Gly12Val	c.35G>T	21.60
12	p.Gly12Cys	c.34G>T	5.40
23	p.Leu23=	c.67C>T	2.70

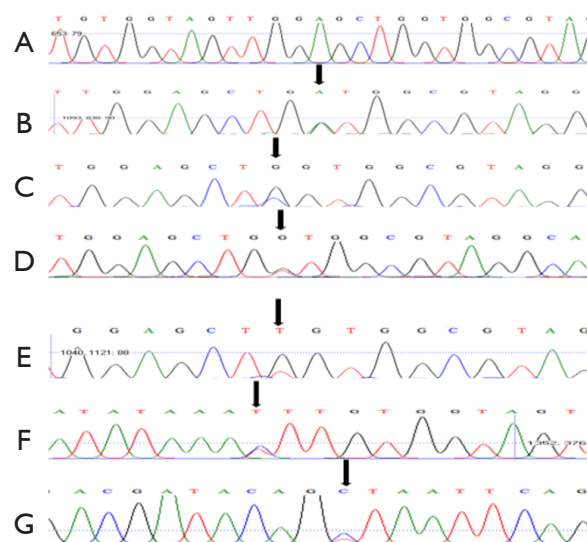


图 2 KRAS 基因 2 号外显子测序图

Figure 2 KRAS gene exon 2 sequence map

(A) 野生型; (B-E) 箭头所示为第 12 密码子错义突变; (F, G) 箭头所示分别第 6 密码子错义突变、第 23 密码子同义突变。(A) Wild type; (B-E) Arrows show the 12 codon missense mutation; (F, G) Arrows show the 6 codon missense mutation and 23 codon synonymous mutation.

表3 KRAS基因2号外显子突变与PDAC临床病理特征

Table 3 Exon 2 of KRAS gene mutations and the clinicopathologic features with PDAC

临床病理类型	总数/[例(%)]	突变型/[例(%)]	野生型/[例(%)]	P
年龄/岁				0.42
≤60	24 (48)	16 (32)	8 (16)	
>60	26 (52)	20 (40)	6 (12)	
性别				0.594
男	28 (56)	21 (42)	7 (14)	
女	22 (44)	15 (30)	7 (14)	
部位				0.066
胰头	20 (40)	15 (30)	5 (10)	
胰体	22 (44)	18 (36)	4 (8)	
胰尾	8 (16)	3 (6)	5 (10)	
肿瘤直径/cm				0.384*
<3	7 (14)	4 (8)	3 (6)	
≥3	43 (86)	32 (64)	11 (22)	
分期				0.006*
I	8 (16)	4 (8)	4 (8)	
IIA	11 (22)	6 (12)	5 (10)	
IIB	16 (32)	16 (32)	0 (0)	
III~IV	15 (40)	10 (32)	5 (10)	
分化程度				0.047*
高	2 (4)	0 (0)	2 (4)	
中	23 (46)	19 (38)	4 (8)	
低	25 (50)	17 (34)	8 (16)	
淋巴结转移				<0.001
有	21 (42)	21 (42)	0 (0)	
无	29 (58)	15 (30)	14 (28)	

*确切概率法。

*Fisher's exact test.

3 讨论

胰腺癌5年生存率小于6%，在我国占因癌症死亡的前10位^[2]，临床上仅15%~20%的胰腺癌患者在确诊后可接受手术治疗^[10]。研究^[11-12]表明：胰腺癌的发生进展涉及原癌基因激活与抑癌基因失活，如KRAS原癌基因的激活，SMAD4和P53等抑癌基因失活。原癌基因KRAS在胰腺癌患者中的突变率为70%~95%^[3,5-6]，主要发生在第12、13、61密码子，其中第12密码子突变约占80%，主要突变类型为p.Gly12Asp与p.Gly12Val^[13]。KRAS基因突变导致RAF-MEK-ERK-MAPK信号转导通路持续性激活，使细胞发生恶性突变，对

肿瘤形成与发展起促进作用^[7]。本研究中KRAS基因第12密码子突变率为72%，p.Gly12Asp与p.Gly12Val占总突变的86%，与文献^[14]报道胰腺癌KRAS突变率与突变类型相似。本实验从1例IIB期患者中检测出2个新突变位点(人类基因突变数据库<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>与ClinVar数据库<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>)，分别是c.16C>T与c.67C>T，其临床意义需进一步的实验验证。本研究中，IIB期与III~IV期患者KRAS突变率高于IIA期与I期患者，分化程度越低、有淋巴结转移者更容易发生KRAS突变。研究^[15]证明：KRAS基因的突变与肿瘤分化程度及肝转移的发生率有关，并且

KRAS基因突变型患者比野生型患者预后更差, 这与本研究结果相似。另外还有研究^[16]发现: 接受EGFR抑制剂尼妥珠单抗联合吉西他滨治疗的KRAS野生型胰腺癌患者总体生存期高于KRAS突变型患者(分别是11.6个月与5.6个月)。简而言之, KRAS突变的患者肿瘤恶性程度高, 预后差, 不适合EGFR靶向药物治疗。

SMAD4是TGF- β 家族各类信号转导过程中共同需要的介质, 对调节TGF- β 家族的信号转导起重要作用, 其失活会使整个TGF- β 信号转导途径中断, 从而失去对肿瘤细胞增殖的抑制作用。研究^[3,17-20]表明: 不同国家和民族PDAC患者SMAD4基因突变率存在一定差异, 突变率为7%~50%。SMAD4的失活与表达降低通常发生在胰腺癌的晚期^[21-23], 并可作为预测胰腺癌患者预后的生物学标志物^[24-28], 在KRAS发生突变的基础上SMAD4表达缺失会促使胰腺肿瘤往更恶性的方向发展^[8-9]。然而与以往研究^[3,17,19-20]不同, 本研究对50例PDAC患者的SMAD4基因进行全外显子测序, 未发现突变。分析主要的原因可能为: 1) 山东地区PDAC患者SMAD4基因突变率低于西方国家, 这种差异可能由地理环境、饮食、遗传等综合因素造成; 2) SMAD4基因突变多发生于晚期的PDAC患者, 本研究中III, IV期病例较少, 也可能是未检测到SMAD4外显子突变的原因之一; 3) 肿瘤标本中的间质细胞和炎细胞可能导致假阴性结果; 4) Sanger测序法检测灵敏度低; 5) 本研究检测样本量小。尽管在本研究中未检测出SMAD4突变, 但不能说明该基因与本地区PDAC的发生发展无关。我们将扩大样本量并优化研究方案, 进一步探讨PDAC患者SMAD4基因改变情况及其临床意义。

本研究中山东地区PDAC患者KRAS基因突变率与突变类型与目前国际报道的数据相符, 其突变与本地区PDAC恶性程度高、预后差相关。SMAD4基因突变在本地区PDAC患者中较为罕见, 提示SMAD4突变可能存在地区差异。对于新发现的KRAS的突变类型, 待进一步研究该突变是否与PDAC的发生发展相关。

参考文献

1. 马臣, 姜永晓, 刘曙正, 等. 中国胰腺癌发病趋势分析和预测[J]. 中华流行病学杂志, 2013, 34(2): 160-163.
2. MA Chen, JIANG Yongxiao, LIU Shuzheng, et al. Trend and prediction on the incidence of pancreatic cancer in China[J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2013, 34(2): 160-163.
3. Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
4. Hahn SA, Hoque AT, Moskaluk CA, et al. Homozygous deletion map at 18q21.1 in pancreatic cancer[J]. Cancer Res, 1996, 56(3): 490-494.
5. Yang J, Li J, Zhu R, et al. K-RAS mutational status in cytohistological tissue as a molecular marker for the diagnosis of pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. Dis Markers, 2014, 2014: 573783.
6. Bamford S, Dawson E, Forbes S, et al. The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website[J]. Br J Cancer, 2004, 91(2): 355-358.
7. Kim ST, Lim DH, Jang KT, et al. Impact of KRAS mutations on clinical outcomes in pancreatic cancer patients treated with first-line gemcitabine-based chemotherapy[J]. Mol Cancer Ther, 2011, 10(10): 1993-1999.
8. Spaargaren M, Bischoff JR, McCormick F. Signal transduction by Ras-like GTPases: a potential target for anticancer drugs[J]. Gene Expr, 1995, 4(6): 345-356.
9. Bardeesy N, Cheng KH, Berger JH, et al. SMAD4 is dispensable for normal pancreas development yet critical in progression and tumor biology of pancreas cancer[J]. Genes Dev, 2006, 20(22): 3130-3146.
10. Izeradjene K, Combs C, Best M, et al. KRAS(G12D) and SMAD4/DPC4 haploinsufficiency cooperate to induce mucinous cystic neoplasms and invasive adenocarcinoma of the pancreas[J]. Cancer Cell, 2007, 11(3): 229-243.
11. Philip PA, Mooney M, Jaffe D, et al. Consensus report of the national cancer institute clinical trials planning meeting on pancreas cancer treatment[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(33): 5660-5669.
12. Hansel DE, Kern SE, Hruban RH. Molecular pathogenesis of pancreatic cancer[J]. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2003, 4: 237-256.
13. Ying H, Dey P, Yao W, et al. Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. Genes Dev, 2016, 30(4): 355-385.
14. Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web[J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(11): 761-774.
15. Yang J, Li J, Zhu R, et al. K-ras mutational status in cytohistological tissue as a molecular marker for the diagnosis of pancreatic cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. Dis Markers, 2014, 2014: 573783.
16. 刘学伟, 程龙伟, 柴淑梅, 等. KRAS基因遗传变异对结肠直肠癌患者预后评估的价值[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(23): 6608-6611.
17. LIU Xuewei, CHENG Longwei, CHAI Shumei, et al. KRAS genetic variation in evaluating prognosis of patients with colorectal cancer Chinese[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2014, 34(23): 6608-6611.
18. Sidaway P. Pancreatic cancer: EGFR inhibition is effective against KRAS-

- wild-type disease[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(9): 524-525.
17. Blackford A, Serrano OK, Wolfgang CL, et al. SMAD4 gene mutations are associated with poor prognosis in pancreatic cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(14): 4674-4679.
 18. De Bosscher K, Hill CS, Nicolas FJ. Molecular and functional consequences of SMAD4 C-terminal missense mutations in colorectal tumour cells[J]. *Biochem J*, 2004, 379(Pt 1): 209-216.
 19. Hayashi H, Kohno T, Ueno H, et al. Utility of assessing the number of mutated KRAS, CDKN2A, TP53, and SMAD4 genes using a targeted deep sequencing assay as a prognostic biomarker for pancreatic cancer[J]. *Pancreas*, 2017, 46(3): 335-340.
 20. Moore PS, Orlandini S, Zamboni G, et al. Pancreatic tumours: molecular pathways implicated in ductal cancer are involved in ampullary but not in exocrine nonductal or endocrine tumorigenesis[J]. *Br J Cancer*, 2001, 84(2): 253-262.
 21. Iacobuzio-Donahue CA, Wilentz RE, Argani P, et al. DPC4 protein in mucinous cystic neoplasms of the pancreas: frequent loss of expression in invasive carcinomas suggests a role in genetic progression[J]. *Am J Surg Pathol*, 2000, 24(11): 1544-1548.
 22. Wilentz RE, Iacobuzio-Donahue CA, Argani P, et al. Loss of expression of DPC4 in pancreatic intraepithelial neoplasia: evidence that DPC4 inactivation occurs late in neoplastic progression[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(7): 2002-2006.
 23. Wilentz RE, Su GH, Dai JL, et al. Immunohistochemical labeling for DPC4 mirrors genetic status in pancreatic adenocarcinomas: a new marker of DPC4 inactivation[J]. *Am J Pathol*, 2000, 156(1): 37-43.
 24. Yamada S, Fujii T, Shimoyama Y, et al. SMAD4 expression predicts local spread and treatment failure in resected pancreatic cancer[J]. *Pancreas*, 2015, 44(4): 660-664.
 25. Shin SH, Kim HJ, Hwang DW, et al. The DPC4/SMAD4 genetic status determines recurrence patterns and treatment outcomes in resected pancreatic ductal adenocarcinoma: a prospective cohort study[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(11): 17945-17959.
 26. Oshima M, Okano K, Muraki S, et al. Immunohistochemically detected expression of 3 major genes (CDKN2A/p16, TP53, and SMAD4/DPC4) strongly predicts survival in patients with resectable pancreatic cancer[J]. *Ann Surg*, 2013, 258(2): 336-346.
 27. Jiang H, He C, Geng S, et al. RHOT1 and SMAD4 are correlated with lymph node metastasis and overall survival in pancreatic cancer[J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e42234.
 28. Tascilar M, Skinner HG, Rosty C, et al. The SMAD4 protein and prognosis of pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Clinical Cancer Res*, 2001, 7(12): 4115-4121.

本文引用: 李永星, 邢晓明, 李胜勇, 王丽丽, 李广起, 宋琳, 杨平. 胰腺导管腺癌患者KRAS与SMAD4基因的突变情况[J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(12): 2543-2548. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.12.005

Cite this article as: LI Yongxing, XING Xiaoming, LI Shengyong, WANG Lili, LI Guangqi, SONG Lin, YANG Ping. KRAS and SMAD4 gene mutations in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2017, 37(12): 2543-2548. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.12.005