

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.10.012

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2020.10.012>

微卫星不稳定和 RAS 基因突变与 III~IV 期大肠癌预后的相关性

孙屏, 郭兴美, 吕慧, 徐蓉蓉

(南京医科大学附属无锡第二医院病理科, 江苏 无锡 214002)

[摘要] 目的: 探讨III~IV期大肠癌患者微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)状态和RAS基因突变与临床病理特征及预后的关系。方法: 检测202例III~IV期大肠癌组织中KRAS, NRAS和BRAF基因突变情况以及MSI状态, 分析不同临床病理参数组别的基因突变情况与预后的关系。结果: 202例III~IV期结直肠癌(colorectal cancer, CRC)中KRAS基因突变, BRAF突变和高度微卫星不稳定性(microsatellite instability-high, MSI-H)肿瘤主要发生在右半结肠, 伴有黏液腺癌的肿瘤中, 而p53突变更多发生在直肠, 不伴有黏液腺癌的肿瘤中。单因素分析显示III期CRC中, RAS突变型与野生型相比, 无进展生存时间(progression-free survival time, PFS)显著缩短(HR: 1.804, 95%CI: 1.159~2.808; P=0.009), 在III期CRC中, 双野生型组(KRAS, NRAS, BRAF3个基因中有1个突变的)与3个基因均是野生型的比较, PFS显著缩短(HR: 1.962, 95%CI: 1.254~3.071; P=0.003)。同样, 在多因素分析时, III期CRC中RAS和BRAF均为野生型的患者, PFS与带有任一突变型的相比显著延长(HR: 1.962, 95%CI: 1.253~3.071; P=0.003)。而单因素、多因素分析, 均未发现RAS突变、BRAF突变各亚组间总生存时间(overall survival time, OS)有统计学差异。结论: RAS, BRAF突变以及MSI状态对III~IV期大肠癌预后有一定的预测作用, 有待于大样本以及精细分组后的验证。

[关键词] 大肠癌; III~IV期; MSI; RAS基因; 预后

Relationship between microsatellite instability, RAS gene mutation and prognosis of stage III–IV colorectal cancer

SUN Ping, GUO Xingmei, LÜ Hui, XU Rongrong

(Department of Pathology, The Second Affiliated People's Hospital of Wuxi, Nanjing Medical University, Wuxi Jiangsu 214002, China)

Abstract **Objective:** To investigate the relationship between RAS gene mutation, microsatellite instability (MSI) status and clinicopathological features and prognosis in patients with colorectal cancer. **Methods:** KRAS, NRAS and BRAF gene mutations and MSI status were examined in 202 patients with colorectal cancer. Statistical methods were used to analyze the relationship between gene mutations with clinicopathological features and prognosis in different groups, such as age, sex, tumor size, degree of differentiation, and so on. **Results:** KRAS gene mutation,

收稿日期 (Date of reception): 2020-02-05

通信作者 (Corresponding author): 吕慧, Email: sspingsun053169@163.com

基金项目 (Foundation item): 无锡市卫健委科研项目 (MS201930)。This work was supported by Wuxi Health Commission Scientific Research Project, China (MS201930).

BRAF gene mutation and microsatellite instability-high (MSI-H) tumor mainly occurred in the right colon with mucinous adenocarcinoma, while p53 mutation occurred more frequently in rectal tumors without mucinous adenocarcinoma. Univariate analysis showed that the progression-free survival time (PFS) of the *RAS* mutant in stage III CRC was significantly shorter than that of the wild type (HR: 1.804, 95%CI: 1.159 to 2.808; $P=0.009$). In the stage III CRC, the PFS of the double wild type group (one of the three genes *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*) was significantly shorter than that of all three wild types (HR: 1.962, 95%CI: 1.254 to 3.071; $P=0.003$). Similarly, in multivariate analysis, both *RAS* and *BRAF* in stage III CRC were wild type, PFS was significantly longer than that in patients with any mutant type (HR: 1.962, 95%CI: 1.253 to 3.071; $P=0.003$). However, univariate and multivariate analysis showed that there was no significant difference in overall survival (OS) time among *RAS* mutation and *BRAF* mutation subgroups. **Conclusion:** *RAS*, *BRAF* mutation and MSI status can predict the prognosis of stage III and IV colorectal cancer, which need to be verified by large sample size and fine grouping.

Keywords colorectal cancer; stage III to IV; MSI; *RAS* gene; prognosis

随着结直肠癌(colorectal cancer, CRC)发病率的增高, 识别与CRC易感和进展相关的因素尤为重要。在局部晚期以及晚期CRC中, *KRAS*, *BRAF*基因状态以及微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)状态与CRC预后的关系还不明确。

文献[1]报道: II期CRC伴有*KRAS*基因突变的患者, 肿瘤复发的概率更高。而在这类患者中, 化疗可以降低转移及复发的风险。一项中国人群的研究^[2]结果显示: II期和III期CRC患者, *KRAS*突变型人群和野生型人群术后接受辅助化疗的生存并无区别。而那些没有接受化疗的患者中, *KRAS*突变型总生存时间(overall survival time, OS)更短。*RAS*基因与MSI状态组合与CRC的预后相关性, 在西方人群中已有报道^[3-4], 但在中国人群中, *RAS*与MSI组合预测CRC预后的临床价值还不明确。

本研究回顾性分析III~IV期CRC患者*RAS*, *BRAF*, MSI与临床病理参数以及预后的相关性, 整合分析三者与CRC不同分期, 不同临床病理参数亚组预后以及治疗的相关性, 为明确CRC患者的预后相关的分子指标提供循证医学依据。

1 材料与方法

1.1 标本

202例CRC组织标本来自2015年1月至2018年4月南京医科大学附属无锡第二医院普外科行手术切除的患者, 本研究得到南京医科大学附属无锡第二医院医学伦理委员会的同意。患者分期依据为AJCC第七版(the 7th edition American Joint Committee on Cancer staging)^[2], 所有患者均接受

外科手术, 术后接受辅助化疗及靶向治疗。纳入标准: 南京医科大学附属无锡第二医院行根治性或姑息性手术的CRC患者; 无术前放化疗; 经病理确诊; 可通过电子病历系统获得详细的临床信息(肿瘤大体类型、分化程度、TNM分期、有无淋巴结转移、浸润深度、有无肿瘤远处转移、是否伴随腺瘤及分化程度)。排除标准: 阑尾或肛管来源的腺瘤; 结肠外有第二原发肿瘤; 病理为鳞状细胞癌、恶性黑色素瘤、胃肠道间质瘤、高级别上皮内瘤变(黏膜内癌)。

随访要求: OS指手术日至死亡日期/随访结束日期。无进展生存期(progression-free survival, PFS)指手术日至肿瘤进展(包括肿瘤复发、出现新转移灶、死亡、肿瘤增长超过30%)。随访时间从手术日开始至死亡或最后1次随访日期。术后2年内每6个月随访1次, 术后第3年起, 每年随访1次。至本研究结束(末次随访日期为2019年3月9日), 所有患者的平均随访时间为12~51(平均23)个月。随访数据来源于住院电子病历系统或电话随访患者及患者家属。随访内容为肠镜检查、盆腹腔和胸部CT检查。

1.2 *KRAS*/*NRAS*/*BRAF*突变检测

基因组DNA抽提: 所有标本均经4%甲醛固定石蜡包埋。采用厦门艾德公司(中国)的DNA提取试剂盒抽提组织DNA, 常规切片4 μm 厚5~10张, 脱蜡、水化。1张HE染色观察形态, 其余用于下一步提取DNA。显微镜下观察HE切片, 选取富于肿瘤细胞的区域, 保证肿瘤成分在80%以上。对应HE切片将肿瘤组织刮入EP管中, 常规脱蜡处理,

加适量的裂解液和蛋白酶, 55 °C 水浴过夜消化、沉淀、洗盐、收集提取的DNA。

突变分析: 运用厦门艾德生物医药科技股份有限公司生产的人KRAS, NRAS和BRAF基因突变检测试剂盒, 根据试剂盒说明书检测KRAS基因第2, 3, 4外显子上12种体细胞突变(G12D, G12A, G12C, G12V, G12S, G13D, Q61H, K117N, K117N, A146T, A146V, A146P), NRAS基因第2和3外显子上3种体细胞突变(G12D, Q61R, Q61K)和BRAF 15号外显子密码子600(V600E)基因突变。总反应体系均为35 μL, 其中包括模板DNA 5 μL, 反应混合液30 μL (KRAS/BRAF或NRAS PCR

反应液, KRAS/BRAF或NRAS引物探针混合液, Taq酶液); 每次反应均设置阳性、阴性对照及外控。所有的反应试剂均由此试剂盒提供。荧光定量PCR仪为SLAN-96 S Real-Time PCR仪。KRAS/BRAF或NRAS基因突变检测的PCR反应条件为95 °C, 5 min; 95 °C, 25 s; 64 °C, 20 s; 72 °C, 20 s, 共15个循环; 93 °C, 25 s; 60 °C, 35 s; 72 °C, 20 s, 共31个循环。反应结束后根据PCR仪说明书及荧光曲线的实际状况进行手动或自动调整基线和阈值, PCR仪即可得到各样本的突变Ct值, 对照说明书判读KRAS/BRAF或NRAS基因突变情况。试剂盒中所用引物及探针序列见表1。

表1 KRAS, NRAS, BRAF PCR检测引物序列

Table 1 Primer sequences of KRAS, NRAS and BRAF

引物名称	序列(5'-3')
K-ras-R12	TCCTGCACCAGTAATATGCATATTTAAAACAAG
K-M1-F18	ACTGAATATAAACTTGTGGTAGITGGAGCTGA
K-M4-F19	GACTGAATATAAACTTGTGGTAGITGGAGCTA
K-block4	TGAATATAAACTTGTGGTAGITGGAGCTGGTGG-NH2
K-M3-F25	GGTACTGGTGGAGTATTTGATAGTGTATTAACC
K-M16-R11	ATCGTCAAGGCACTCTTGCCTACGCCACA
K-M15-R10	TATCGTCAAGGCACTCTTGCCTACGCCACG
K-M3-R10	TATCGTCAAGGCACTCTTGCCTACGCCAA
K-M12-R10	ATCGTCAAGGCACTCTTGCCTACGCCAG
K-M14-R3	GCTGTATCGTCAAGGCACTCTTGCCTACGCA
K-M7-F19	CTGAATATAAACTTGTGGTAGITGGAGCTGGTGA
K-M15-F1	TCAGGATTCCTACAGGAAGCAAGTAGT
K-M15-R2	GTACTGGTCCCTCATTCCTACTCCTCTA
K-M16-R4	TACTGGTCCCTCATTCCTACTCCTCTC
K-M16-R5	TGTACTGGTCCCTCATTCCTACTCCTCG
K-M18-R1	ACTGGTCCCTCATTCCTACTCCTCA
K-M21-F2	ACTCTGAAGATGTACCTATGGTCTAGTAGGAAATAAT
K-M22-F2	GGACTTAGCAAGAAGTATGGAATTCCTTTTATGAAACATCAA
K-M23-F4	GGACTTAGCAAGAAGTATGGAATTCCTTTTATGAAACATCAGT
K-M22-R2	TGACATAACAGTTATGATTTGCAGAAAACAGATC
NRAS-M3-R2	TGGGATCATATTCATCTACAAAAGTGGT
NRAS-M3-F5	TACAAACTGGTGGTGGITGGAGCAGA
NRAS-M10-F2	CAAACCTGGTGGTGGITGGAGCAA
NRAS-M3-R1	GGCTACCACTGGGCCTCACCTCTATGGTG

续表1

引物名称	序列(5'-3')
NRAS-M4-F5	TGGTGGTGGTGGAGCAGGTGA
NRAS-M6-F2	CCTGATTACTGGTTTCCAACAGGT
NRAS-M6-R1	ATTGTCAGTGCCTTTCCCAACACG
NRAS-M7-R2	TCAGTGCCTTTCCCAACACCACA
NRAS-M9-R3	ATTGTCAGTGCCTTTCCCAACACCAA
NRAS-M11-R3	TTGTCAGTGCCTTTCCCAACACCAG
NRAS-M14-R4	GATTGTCAGTGCCTTTCCCAACAA
NRAS-M1-F2	CCAGGATTCTACAGAAAACAAGTGGT
NRAS-M1-R1	GTCTCTCATGGCACTGTACTCTTCTC
NRAS-M2-R3	GTCTCTCATGGCACTGTACTCTTCTT
NRAS-M5-R4	TTGGTCTCTCATGGCACTGTACTCTTCTA
NRAS-M8-R5	TGGTCTCTCATGGCACTGTACTCTTCG
NRAS-M12-R2	CACATCTCTACCAGAGTTAATCAACTGATGC
NRAS-M12-F1	GAGTTACGGGATTCATTCAITGAAACCTCAA
NRAS-M12-block1	GTTACGGGATTCATTCAITGAAACCTCAGC-NH2
B-raf-F5	GTAAAAATAGGTGATTTGGTCTAGCTACAGA
B-raf-R3	AATTAATCAGTGAAAAATAGCCTCAATTCCTACC
PI-EX8-F2	GAGTTGGAGTTGACTGGTTCAGCA
PI-EX8-R2	CCTGCGTGGGAATAGCTAAATCCT
K-EX23-F1	GCTGAGGTAGGAGAATCGCTTGAA
K-EX23-R1	TGGAGTCTTGCTCTGTTCCTA
E-EX9-F1	TGTGTAACGGAATAGGTATGGTGAATT
E-EX9-R1	GCCACCGGCAGGATGTGGAGAT

1.3 肿瘤组织错配修复蛋白表达及微卫星不稳定性检测

免疫组织化学方法检测错配修复蛋白(mismatch repair protein, MMR) MLH1, PMS2, MSH2, MSH6表达鼠单克隆抗体购自福州迈新公司。肿瘤旁正常组织为正常内阳性对照。MMR蛋白缺失表现为肿瘤组织核表达阴性, 而肿瘤旁正常结肠黏膜上皮及淋巴细胞核阳性。当任何1个蛋白表达缺失即定义为错配修复蛋白功能缺陷(MMR deficient, dMMR)。均阳性则为错配修复蛋白功能正常(MMR proficient, pMMR)。

Sanger测序法检测MSI, 从石蜡组织中提取基

因组DNA, Sanger测序检测MSI的5个单核苷酸重复标志物BAT-25, MONO-27, CAT-25, BAT-26, NR-24的改变, 有2个及以上改变为高度微卫星不稳定性(microsatellite instability-high, MSI-H), 1个改变为低度微卫星不稳定性(microsatellite instability-low, MSI-L), 无改变为微卫星稳定(microsatellite stable, MSS)。

1.4 肿瘤组织p53蛋白表达

免疫组织化学方法检测p53蛋白表达, 肿瘤组织75%以上核弥漫强阳性或<5%染色或全阴性, 则为p53突变型, 5%~75%强弱不等阳性表达为p53蛋白野生型(图1)。

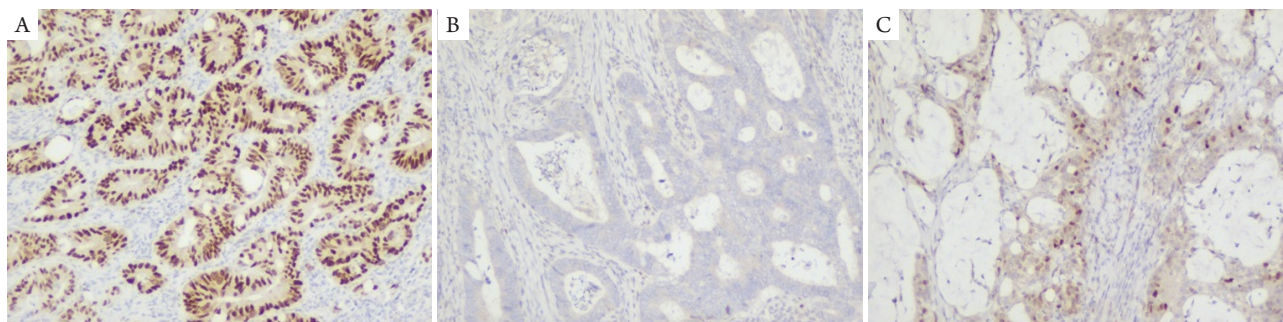


图1 免疫组织化学方法检测p53蛋白表达情况(SP, ×100)

Figure 1 Detection of p53 protein expression by immunohistochemistry (SP, ×100)

(A, B)肿瘤组织75%以上核弥漫强阳性或<5%染色或全阴性, 为p53突变型; (C)5%~75%强弱不等阳性表达, 为p53蛋白野生型。

If more than 75% of the nuclei in tumor tissues of (A) and (B) are diffusely strongly positive or less than 5% stained or all negative, it is p53 mutant type, and the unequal strength expression between 5% and 75% of (C) is p53 wild type.

1.5 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件, 以 χ^2 检验分析基因突变与性别、年龄、肿瘤原发部位等临床病理特征之间的相关性。不满足卡方检验条件的用Fisher精确概率法统计, 以Kaplan-Meier法分析基因突变与转移、术后复发及病死率、患者生存情况, Log-Rank检验生存率, 并对预后因素行单因素及cox多因素回归分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床病理学特征

在202例CRC病例中, 男129例, 女73例, 男女比例为1.8:1, 平均年龄67.64岁, 中位年龄69岁。其中104例患者 ≥ 69 岁, 98例患者 < 69 岁。结肠癌159例, 其中85例为左半结肠癌, 74例为右半结肠癌, 直肠癌43例。肿瘤长径 < 3 cm者22例, 3~5 cm者94例, ≥ 5 cm者86例。无黏液腺癌分化165例, 伴有黏液腺癌分化37例。分化程度好的(高分化、中分化腺癌)184例, 分化程度差的(包含低分化腺癌、印戒细胞癌、黏液腺癌)18例。有淋巴结转移179例、无转移23例。浸润深度: 黏膜层或肌层(T1~2)者12例, 浆膜层或结直肠周围组织及器官(T3~4)190例。有远处转移者51例、无远处转移者151例。大体隆起型59例、溃疡型135例、浸润型8例。31例同时伴有结直肠癌, 其中7例腺癌伴有高级别上皮内瘤变或灶性癌变、171例无伴有腺

瘤; 41例无术后治疗(20.29%)、142例术后辅助化疗(FOLFOX方案)、19例术后辅助化疗和靶向治疗(FOLFOX方案+西妥昔单抗/贝伐单抗; 表2)。

2.2 III期和IV期CRC中基因突变状态与临床病理参数相关性分析

本组数据显示: KRAS和NRAS基因突变互相排斥, RAS基因突变和BRAF基因突变相互排斥。MSI肿瘤主要发生在BRAF突变型和RAS野生型患者中。p53蛋白突变型主要发生在RAS野生型和BRAF野生型中。MSI肿瘤与p53蛋白突变型无明显统计学相关性。在散发性CRC中, MSI肿瘤与BRAF突变明显相关(表3)。

2.3 KRAS, NRAS基因突变特征及其与临床病理的相关性

检测CRC中KRAS基因第2, 3, 4外显子共12种热点突变类型, 总突变率为40.6%(82/202)。202例III期和IV期CRC中, 伴有黏液腺癌肿瘤中KRAS基因突变率高于不伴有黏液腺癌KRAS基因突变率。右半结肠KRAS基因突变率高于左半结肠及直肠KRAS基因突变率。KRAS基因突变性别、年龄、肿瘤大体类型、肿瘤大小、分化程度、TNM分期、有无淋巴结转移、浸润深度、治疗情况、增殖指数、伴发腺瘤等均无相关性(均 $P > 0.05$)。NRAS基因突变率为3.95%(8/202), 联合RAS检测, 与各指标的差异均无统计学意义(表3)。

表2 III期及IV期CRC患者临床病理学特征($n=202$)Table 2 Clinicopathological features of patients with CRC in stage III and stage IV ($n=202$)

临床参数	<i>n</i>	占比/%	临床参数	<i>n</i>	占比/%
性别			淋巴结转移		
男	129	63.86	无N0	23	11.39
女	73	36.14	有N1+N2	179	88.61
年龄/岁			浸润深度		
<69	98	48.51	T1~2	12	5.94
≥69	104	51.49	T3~4	190	94.06
伴有黏液腺癌			远处转移		
否	165	81.68	无M0	151	74.75
是	37	18.32	有M1	51	25.25
肿瘤长径/cm			治疗		
<3	22	10.89	无化疗	41	20.29
3~<5	94	46.53	化疗	142	70.30
≥5	86	42.57	化疗+单抗	19	9.41
大体			Ki-67增殖		
隆起型	59	29.21	1+	6	2.97
溃疡型	135	66.83	2+	23	11.39
浸润型	8	3.96	3+	173	85.64
部位			腺瘤		
左半结肠	85	42.08	无	171	84.65
右半结肠	74	36.63	腺瘤	24	11.88
直肠	43	21.29	腺瘤+高级别/癌变	7	3.47
分化程度					
低	18	8.91			
高/中	184	91.09			

2.4 BRAF基因突变特征与临床病理相关性

检测CRC中BRAF基因第600位密码子突变GTG>GAG(V600E), 突变率为4.95%(10/202)。202例III期和IV期CRC中, 伴有黏液腺癌肿瘤中BRAF基因突变率高于不伴有黏液腺癌BRAF基因突变率。女性中BRAF突变率显著高于男性中BRAF突变率。右半结肠KRAS基因突变率高于左半结肠及直肠KRAS基因突变率。BRAF基因突变与年龄、肿瘤大体类型、肿瘤大小、分化程度、TNM分期、有无淋巴结转移、浸润深度、治疗情况、增殖指数、伴发腺瘤等均无相关性(均 $P>0.05$, 表3)。

2.5 MSI状态及其与临床病理相关性

检测CRC中MSI-H肿瘤百分比为7.92%(16/202)。本组202例III期和IV期CRC中, MSI-H肿瘤在女性患者的发生率显著高于男性患者的发生率。右半结肠肿瘤的MSI-H比例高于左半结肠及直肠肿瘤的比例。伴有黏液腺癌的肿瘤中MSI-H发生率显著高于不伴有黏液腺癌的肿瘤。MSI-H肿瘤与患者年龄、肿瘤大体类型、肿瘤大小、分化程度、TNM分期、有无淋巴结转移、有无远处转移、浸润深度、治疗情况、增殖指数、伴发腺瘤等均无相关性(均 $P>0.05$, 表3)。

表3 III期及IV期CRC患者不同临床特征的基因突变率分析
Table 3 Analysis of gene mutation rates of different clinical features in patients with CRC in stage III and stage IV

临床特征	n	KRAS mt/ [例(%)]	P	NRAS mt/ [例(%)]	P	BRAF mt/ [例(%)]	P	Any mt (KRAS/ NRAS)/[例(%)]	P	MSI-H/ [例(%)]	P	p53/[例(%)]	P
KRAS突变状态													
野生型	120	—	—	2.23E-02	0.0062	—	—	—	—	—	0.0696	—	0.0017
突变型	82	—	—	8 (6.67)	10 (8.33)	—	—	—	—	13 (10.83)	—	88 (73.33)	—
				0 (0.00)	0 (0.00)	—	—	—	—	3 (3.66)	—	42 (51.22)	—
NRAS突变状态													
野生型	194	82 (42.27)	—	—	10 (5.15)	—	1	—	—	16 (8.25)	1.0000	123 (63.40)	0.2636
突变型	8	0 (0.00)	—	—	0 (0.00)	—	—	—	—	0 (0.00)	—	7 (87.50)	—
BRAF突变状态													
野生型	192	82 (42.71)	0.0062	8 (4.17)	—	—	—	90 (46.88)	0.0025	7 (3.65)	8.59E-11	127 (66.15)	0.0364
突变型	10	0 (0.00)	—	0 (0.00)	—	—	—	0 (0.00)	—	9 (90.00)	—	3 (30.00)	—
KRAS及NRAS突变状态													
双野生型	112	—	—	—	10 (8.93)	—	0.0025	—	—	13 (11.61)	0.0363	81 (72.32)	0.0118
突变型	90	—	—	—	0 (0.00)	—	—	—	—	3 (3.33)	—	49 (54.44)	—
p53突变状态													
野生型	72	40 (55.56)	0.0017	1 (1.39)	0.2636	7 (9.72)	0.0364	41 (56.94)	0.0118	9 (12.50)	0.1011	—	—
突变型	130	42 (32.31)	—	7 (5.38)	—	3 (2.31)	—	49 (37.69)	—	7 (5.38)	—	—	—
MMR													
pMMR	184	78 (42.39)	0.1315	8 (4.35)	1.00E+00	1 (0.54)	3.62E-10	86 (46.74)	0.0504	0 (0.00)	<2.2E-16	123 (66.85)	0.0361
dMMR	18	4 (22.22)	—	0 (0.00)	—	9 (50.00)	—	4 (22.22)	—	16 (88.89)	—	7 (38.89)	—
性别													
男	129	54 (41.86)	0.6569	3 (2.33)	0.1406	3 (2.33)	0.0378	57 (44.19)	1.0000	6 (4.65)	0.0298	88 (68.22)	0.1685
女	73	28 (38.36)	—	5 (6.85)	—	7 (9.59)	—	33 (45.21)	—	10 (13.70)	—	42 (57.53)	—

续表3

临床特征	n	KRAS mt/ [例(%)]	P	NRAS mt/ [例(%)]	P	BRAF mt/ [例(%)]	P	Any mt (KRAS/ NRAS)/[例(%)]	P	MSI-H/ [例(%)]	P	p53/[例(%)]	P
年龄/岁			0.1153		1.0000		0.5282		0.1207		0.7969		0.1057
<69	98	34 (34.69)		4 (4.08)		6 (6.12)		38 (38.78)		7 (7.14)		69 (70.41)	
≥69	104	48 (46.15)		4 (3.85)		4 (3.85)		52 (50.00)		9 (8.65)		61 (58.65)	
伴有黏液腺癌			0.0406		0.3554		0.0199		0.1040		0.0004		0.0012
否	165	61 (36.97)		8 (4.85)		5 (3.03)		69 (41.82)		7 (4.24)		115 (69.70)	
是	37	21 (56.76)		0 (0.00)		5 (13.51)		21 (56.76)		9 (24.32)		15 (40.54)	
分化程度			0.8034		0.5330		1.0000		0.6298		0.6400		0.4456
低	18	8 (44.44)		1 (5.56)		1 (5.56)		9 (50.00)		2 (11.11)		10 (55.56)	
高/中	184	74 (40.22)		7 (3.80)		9 (4.89)		81 (44.02)		14 (7.61)		120 (65.22)	
肿瘤长径/cm			0.6605		0.8851		0.0664		0.4236		0.0968		0.0445
<3	22	7 (31.82)		0 (0.00)		0 (0.00)		7 (31.82)		1 (4.55)		18 (81.82)	
3~<5	94	38 (40.43)		4 (4.26)		2 (2.13)		42 (44.68)		4 (4.26)		64 (68.09)	
≥5	86	37 (43.02)		4 (4.65)		8 (9.30)		41 (47.67)		11 (12.79)		48 (55.81)	
大体			1.0000		1.0000		0.1755		1.0000		0.2598		0.1910
隆起型	59	24 (40.68)		2 (3.39)		5 (8.47)		26 (44.07)		7 (11.86)		34 (57.63)	
溃疡型	135	55 (40.74)		5 (3.70)		5 (3.70)		60 (44.44)		9 (6.67)		92 (68.15)	
部位			0.0062		0.1015		0.0201		0.0542		0.0009		5.62E-07
左半结肠	85	31 (36.47)		3 (3.53)		1 (1.18)		34 (40.00)		2 (2.35)		65 (76.47)	
右半结肠	74	40 (54.05)		1 (1.35)		8 (10.81)		41 (55.41)		13 (17.57)		30 (40.54)	
直肠	43	11 (25.58)		4 (9.30)		1 (2.33)		15 (34.88)		1 (2.33)		35 (81.40)	
淋巴结转移			0.8232		0.6010		0.6079		1.0000		1.0000		0.8177
无N0	23	10 (43.48)		0 (0.00)		0 (0.00)		10 (43.48)		2 (8.70)		14 (60.87)	
有N1+N2	179	72 (40.22)		8 (4.47)		10 (5.59)		80 (44.69)		14 (7.82)		116 (64.80)	

续表3

临床特征	n	KRAS mt/ [例(%)]	P	NRAS mt/ [例(%)]	P	BRAF mt/ [例(%)]	P	Any mt (KRAS/ NRAS)/[例(%)]	P	MSI-H/ [例(%)]	P	p53/[例(%)]	P
浸润深度			0.7650		0.0743		1.0000		0.7694		1.0000		0.2189
T1-2	12	4 (33.33)		2 (16.67)		0 (0.00)		6 (50.00)		1 (8.33)		10 (83.33)	
T3-4	190	78 (41.05)		6 (3.16)		10 (5.26)		84 (44.21)		15 (7.89)		120 (63.16)	
远处转移			0.0993		0.6823		1.0000		0.1932		0.5565		0.6125
无M0	151	56 (37.09)		7 (4.64)		8 (5.30)		63 (41.72)		11 (7.28)		99 (65.56)	
有M1	51	26 (50.98)		1 (1.96)		2 (3.92)		27 (52.94)		5 (9.80)		31 (60.78)	
治疗			0.7177		1.0000		0.7648		0.3063				
无化疗	41	19 (46.34)		2 (4.88)		1 (2.44)		21 (51.22)		1 (2.44)		26 (63.41)	0.5103
化疗	142	56 (39.44)		6 (4.23)		8 (5.63)		62 (43.66)		14 (9.86)		94 (66.20)	
化疗+单抗	19	7 (36.84)		0 (0.00)		1 (5.26)		7 (36.84)		1 (5.26)		10 (52.63)	
Ki-67增殖			0.1622		1.0000		0.1110		0.1199		0.4312		0.0248
1+	6	1 (16.67)		0 (0.00)		1 (16.67)		1 (16.67)		1 (16.67)		4 (66.67)	
2+	23	13 (56.52)		1 (4.35)		2 (8.70)		14 (60.87)		2 (8.70)		9 (39.13)	
3+	173	68 (39.31)		7 (4.05)		7 (4.05)		75 (43.35)		13 (7.51)		117 (67.63)	
腺瘤			0.2312		0.6991		1.0000		0.4065		0.6794		0.1351
无	171	67 (39.18)		8 (4.68)		9 (5.26)		75 (43.86)		13 (7.60)		111 (64.91)	
腺瘤	24	10 (41.67)		0 (0.00)		1 (4.17)		10 (41.67)		3 (12.50)		17 (70.83)	
腺瘤+高级别/ 癌变	7	5 (71.43)		0 (0.00)		0 (0.00)		5 (71.43)		0 (0.00)		2 (28.57)	

2.6 p53蛋白表达特征及其临床病理相关性

检测202例CRC中p53蛋白表达情况, 突变型表达为64.36%(130/202)。伴有黏液腺癌的肿瘤中p53突变率显著低于不伴有黏液腺癌的肿瘤。右半结肠肿瘤中p53突变型肿瘤发生率显著低于左半结肠及直肠。p53突变型与患者年龄、性别、肿瘤大体类型、分化程度、有无淋巴结转移、浸润深度、有无远处转移、治疗情况、伴发腺瘤等均无相关性(均 $P>0.05$, 表3)。

2.7 不同TNM分期中RAS, BRAF突变组PFS和OS分析

单因素分析显示: 在III期CRC中, RAS突变型与野生型相比, PFS显著缩短($P=0.009$), 而

OS差异无统计学意义($P=0.415$); BRAF突变型与野生型相比, PFS和OS均差异无统计学意义; 同样, 双野生型组(KRAS, NRAS, BRAF3个基因其中有1个突变的)与3个基因均是野生型的比较, PFS显著缩短($P=0.00319$), 而OS差异无统计学意义($P=0.331$), 复发风险增高, HR大于1, 即只要带有1个突变, 复发风险就增高。

在IV期CRC中, RAS突变型与野生型、BRAF突变型与野生型相比, 双野生型组与3个基因均是野生型组比较, PFS和OS均差异无统计学意义(表4)。同样, 在多因素分析时, III期CRC中RAS和BRAF均为野生型的患者, PFS与带有任一突变型的相比, PFS显著延长($P=0.003$, 表5)。

表4 基因突变及临床分期生存分析(单因素分析)

Table 4 Gene mutation and clinical staging survival analysis of PFS and OS (univariate analysis)

TNM分期	PFS		OS	
	HR (95%CI)	P	HR (95%CI)	P
III期				
KRAS + NRAS突变型	1.804 (1.159~2.808)	0.009	1.363 (0.6476~2.869)	0.415
BRAF突变型	1.588 (0.6388~3.945)	0.320	1.319 (0.3126~5.566)	0.706
双野生型	1.962 (1.254~3.071)	0.003	1.446 (0.6872~3.041)	0.331
IV期				
KRAS + NRAS突变型	1.532 (0.7657~3.065)	0.228	1.742 (0.69~4.399)	0.240
BRAF突变型	0.4111 (0.05571~3.035)	0.383	0.8477 (0.1126~6.383)	0.873
双野生型	1.312 (0.6498~2.648)	0.449	1.737 (0.6602~4.569)	0.263

表5 基因突变及临床分期生存分析(多因素分析)

Table 5 Gene mutation and clinical staging survival analysis of PFS and OS (multivariate analysis)

TNM分期	PFS		OS	
	HR (95%CI)	P	HR (95%CI)	P
III期				
双野生型	1.962 (1.253~3.071)	0.003	无显著意义变量	—
IV期				
	无显著意义变量	—	无显著意义变量	—

3 讨论

CRC的发生、发展是一个受多基因、多步骤调控的复杂过程, 选择合适的生物标志物对CRC

的诊断、治疗和预后具有深远意义。近年来, CRC的治疗领域中最大亮点是确定KRAS基因状态与抗EGFR单抗疗效的相关性, 针对治疗靶点RAS, BRAF, MSI的检测是临床进行个体化治疗的前

提^[5]。以往的研究^[2,6-10]都是关注KRAS, MSI与临床病理参数的相关性, 很少有研究关注两者与CRC预后的相关性。之前的研究^[1-2]一致认为: II期CRC dMMR患者的预后好于pMMR患者, 并不能从单药5-氟尿嘧啶(5-FU)化疗中获益。但在晚期CRC中与预后的相关性并不明确。有研究^[11-12]显示: III期CRC接受FOLFOX或者FOLFOX+西妥昔单抗治疗, dMMR组的预后好于pMMR组, 但仅在FOLFOX治疗组(dMMR组对FOLFOX治疗获益更多)。因此, MMR/MSI检测也有预后价值。dMMR/MSI-H肿瘤超突变, 产生大量移码肽段, 作为新抗原引发活跃的免疫反应, 表现为肿瘤内大量淋巴细胞浸润, 对免疫治疗反应好。但晚期CRC中dMMR/MSI-H肿瘤仅4%。因此, 如何预测晚期CRC预后作用不明确。RAS, BRAF和MMR/MSI组合后的预后价值仍有争议。

本研究202例III~IV期CRC中RAS突变率为44.55%, 其中KRAS突变率40.59%, NRAS突变率3.96%, BRAF突变率4.95%, MSI肿瘤占比7.92%。与之前中国人群的突变率比相对较低^[13-17], 可能与检测方法、单中心以及样本量有关。本研究中, KRAS突变更多见于右半结肠以及伴有黏液腺癌分化的肿瘤中。BRAF突变, MSI-H更多见于女性、右半结肠以及伴有黏液腺癌的肿瘤中。而NRAS突变在各种临床病理参数的肿瘤分组中无显著性差异。

本研究目的是分析RAS基因、BRAF基因突变以及MSI状态作为CRC预后的独立或联合预测作用。KRAS, BRAF突变在非转移性CRC中的预后预测作用一直以来都是不一致的。一项研究^[18]认为在MSI早期肿瘤中, KRAS及BRAF突变是预后差的相关因子, 但该研究的例数少, 且没有排除化疗因素, 因此结果的有效性值得推敲。现有文献对KRAS, BRAF预后预测作用的不一致性可能与人群的异质性、原发肿瘤部位、接受的辅助治疗等有关。

本研究在晚期肿瘤III期和IV期CRC中分析了KRAS, BRAF突变以及MSI状态与预后的关系, 结果显示: 仅在KRAS, NRAS, BRAF任一突变与短的PFS相关, 而与OS无明显统计学相关, 这与之前的研究^[19-20]结果相符。

本组IV期病例数较少, 共51例, 入组患者中肝转移者29例; 肝脏伴有肺转移3例; 伴有肾上腺转移1例; 伴有盆腔脏器转移(输尿管/膀胱/前列腺/卵巢等)4例; 伴有腹腔及网膜及腹壁转移4例共12例; 肺转移5例(肺伴有腹腔网膜转移3例; 肺

伴有骨转移2例)。51例IV期患者行肠原发灶+肝脏转移灶根治手术5例; 仅原发灶切除39例; 姑息性手术7例。19例联合抗EGFR或VEGFR靶向治疗, 其中4例为姑息性手术, 15例为仅原发灶切除手术患者。联合抗VEGFR靶向治疗(贝伐单抗)15例, 联合抗EGFR靶向治疗(西妥昔单抗)4例, 总结本组纳入研究的晚期样本中进行靶向治疗的病例不足50%的原因是: 1)入组病例是2015—2017年病例, 当时西妥昔单抗还未进入医保, 经济原因导致患者未能选择靶向治疗; 2)入组的51例晚期样本中左半结肠及直肠癌34例, 其中KRAS阳性者15例, 也不能首选西妥昔单抗治疗; 3)当时CRC的多学科诊疗(multi-disciplinary Treatment, MDT)治疗模式还不是很完善, 靶向治疗的理念还没有对患者很好宣教, 以上几个方面导致整体晚期样本中进行靶向治疗的病例较少。相信随着各项指南的不断推陈出新, MDT治疗模式的成熟以及医保对靶向药物的纳入, 可以使更多的晚期大肠癌患者受益精准检测, 靶向治疗。而对于MSI-H mCRC人群, 近年免疫治疗已写入NCCN及CSCO治疗指南, 可显著改善部分人群预后。

另外, 在CRC发展的过程中, 除了RAS, BRAF, MSI, 还有其他驱动基因在发挥作用, 如PI3KCA, HER2, MET等^[21-23]也在CRC的预后中发挥作用。

目前CRC的预后主要是依据T分期和N分期, 本研究发现, RAS, BRAF在MSS肿瘤中是预后的分子标志物, 而在MSI肿瘤中无相关, 因此, 在CRC肿瘤中检测RAS、BRAF和MSI状态, 不仅可以指导临床靶向用药, 可以筛选出MSI-H的肿瘤, 对免疫治疗有明显效应, 还可以作为预后指标。

本临床研究以III期和IV期CRC患者为研究对象, 探讨分析了KRAS, NRAS, BRAF基因表型及MSI状态与此类人群生存预后的相关性, 作为单中心回顾性分析, III期例数占比较高, 相关预后分层分析结论与真实世界临床实践更贴切; 但IV期病例数较少, 经过临床基因表型及微卫星状态、肿瘤部位、临床分期、病理类型等分层分析后, 样本量进一步缩小, 可能对统计结果造成偏倚; 且mCRC具体转移情况及全程管理治疗策略的执行都将直接影响PFS和OS等预后指标, 这些变量也可能对该部分人群研究结果造成偏倚; 后续将扩大样本量、开展前瞻性多指标分层分析, 以提供高质量高级别循证医学证据。

参考文献

- Hutchins G, Southward K, Handley K, et al. Value of mismatch repair, KRAS, and BRAF mutations in predicting recurrence and benefits from chemotherapy in colorectal cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(10): 1261-1270.
- Deng Y, Wang L, Tan S, et al. KRAS as a predictor of poor prognosis and benefit from postoperative FOLFOX chemotherapy in patients with stage II and III colorectal cancer[J]. *Mol Oncol*, 2015, 9(7): 1341-1347.
- Phipps AI, Limburg PJ, Baron JA, et al. Association between molecular subtypes of colorectal cancer and patient survival[J]. *Gastroenterology*, 2015, 148(1): 77-87.e2.
- Sinicrope FA, Shi Q, Smyrk TC, et al. Molecular markers identify subtypes of stage III colon cancer associated with patient outcomes[J]. *Gastroenterology*, 2015, 148(1): 88-99.
- Loupakis F, Cremolini C, Masi G, et al. Initial therapy with FOLFOXIRI and bevacizumab for metastatic colorectal cancer[J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(17): 1609-1618.
- Eilertsen IA, Sveen A, Stromme JM, et al. Alternative splicing expands the prognostic impact of KRAS in microsatellite stable primary colorectal cancer[J]. *Int J Cancer*, 2019, 144(4): 841-847.
- Lee DW, Kim KJ, Han SW, et al. KRAS mutation is associated with worse prognosis in stage III or high-risk stage II colon cancer patients treated with adjuvant FOLFOX[J]. *Ann Surg Oncol*, 2015, 22(1): 187-194.
- Dienstmann R, Mason MJ, Sinicrope FA, et al. Prediction of overall survival in stage II and III colon cancer beyond TNM system: a retrospective, pooled biomarker study[J]. *Ann Oncol*, 2017, 28(5): 1023-1031.
- Tan WJ, Hamzah JL, Acharyya S, et al. Evaluation of long-term outcomes of microsatellite instability status in an asian cohort of sporadic colorectal cancers[J]. *J Gastrointest Cancer*, 2018, 49(3): 311-318.
- Chang L, Chang M, Chang HM, et al. Expanding role of microsatellite instability in diagnosis and treatment of colorectal cancers[J]. *J Gastrointest Cancer*, 2017, 48(4): 305-313.
- Zaanan A, Shi Q, Taieb J, et al. Role of deficient DNA mismatch repair status in patients with stage III colon cancer treated with FOLFOX adjuvant chemotherapy: a pooled analysis from 2 randomized clinical trials[J]. *JAMA Oncol*, 2018; 4(3): 379.
- André T, de Gramont A, Vernerey D, et al. Adjuvant fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin in stage II to III colon cancer: updated 10-year survival and outcomes according to BRAF mutation and mismatch repair status of the MOSAIC Study[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(35): 4176-4187.
- Chen J, Guo F, Shi X, et al. BRAF V600E mutation and KRAS codon 13 mutations predict poor survival in Chinese colorectal cancer patients[J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 802.
- Ma BB, Mo F, Tong JH, et al. Elucidating the prognostic significance of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in Chinese patients with metastatic colorectal cancer[J]. *Asia Pac J Clin Oncol*, 2015, 11(2): 160-169.
- Mao C, Zhou J, Yang Z, et al. KRAS, BRAF and PIK3CA mutations and the loss of PTEN expression in Chinese patients with colorectal cancer[J]. *PLoS One* 2012,7(5): e36653.
- Ye JX, Liu Y, Qin Y, et al. KRAS and BRAF gene mutations and DNA mismatch repair status in Chinese colorectal carcinoma patients[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(5): 1595-1605.
- Petrelli F, Ghidini M, Cabiddu M, et al. Microsatellite instability and survival in stage II colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Anticancer Res*, 2019, 39(12): 6431-6441.
- Benedix F, Meyer F, Kube R, et al. Influence of anatomical subsite on the incidence of microsatellite instability, and KRAS and BRAF mutation rates in patients with colon carcinoma[J]. *Pathol Res Pract*, 2012, 208(10): 592-597.
- Blons H, Emile JF, Le Malicot K, et al. Prognostic value of KRAS mutations in stage III colon cancer: post hoc analysis of the PETACC8 phase III trial dataset[J]. *Ann Oncol*, 2014, 25(12): 2378-2385.
- Sinicrope FA, Mahoney MR, Yoon HH, et al. Analysis of molecular markers by anatomic tumor site in stage III colon carcinomas from Adjuvant Chemotherapy Trial NCCTG N0147 (Alliance)[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(23): 5294-5304.
- Gray RT, Cantwell MM, Coleman HG, et al. Evaluation of pTgs2 expression, p13ca mutation, aspirin use and colon cancer survival in a population-based cohort study[J]. *Clin Transl Gastroenterol*, 2017, 8(4): e91.
- Seo AN, Park KU, Choe G, et al. Clinical and prognostic value of MET gene copy number gain and chromosome 7 polysomy in primary colorectal cancer patients[J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(12): 9813-9821.
- Kavuri SM, Jain N, Galimi F, et al. HER2 activating mutations are targets for colorectal cancer treatment[J]. *Cancer Discov*, 2015, 5(8): 832-841.

本文引用: 孙屏, 郭兴美, 吕慧, 徐蓉蓉. 微卫星不稳定和RAS基因突变与III-IV期大肠癌预后的相关性[J]. 临床与病理杂志, 2020, 40(10): 2569-2580. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.10.012

Cite this article as: SUN Ping, GUO Xingmei, LÜ Hui, XU Rongrong. Relationship between microsatellite instability, RAS gene mutation and prognosis of stage III-IV colorectal cancer[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2020, 40(10): 2569-2580. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2020.10.012