

晚期左右半结肠癌患者组织 MSI、KRAS、 BRAF 状态与疗效的关系研究

Relationship between the status of MSI, KRAS and BRAF and curative effect in patients with advanced left-sided and right-sided colon cancer

吴婷 王燕 涂剑楠 陈声池

福建医科大学附属南平第一医院 福建 南平 胃肠道肿瘤科 353000

【摘要】目的 分析晚期左右半结肠癌患者的微卫星不稳定 (MSI)、原癌基因 (KRAS)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (BRAF) 状态, 探讨其与贝伐珠单抗联合化疗疗效的相关性。方法 回顾性收集2018年1月~2021年12月我院收治的80例晚期结肠癌患者的临床资料, 均接受贝伐珠单抗联合化疗, 根据化疗4周期后疗效分为两组, 分别为疾病控制组 (DC组) 和疾病进展组 (PD组), 其中DC组为57例, PD组为23例。比较两组患者的性别、年龄、功能状态 (KPS) 评分、病理分型、肿瘤部位、MSI、KRAS、BRAF状态, 采用多因素logistic回归分析MSI、KRAS、BRAF状态与疗效的关系。结果 比较DC组与PD组相关因素, 在性别、年龄、功能状态 (KPS) 评分、病理分型、肿瘤部位、KRAS状态方面, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 但PD组的MSI-L+MSS、BRAF突变型占比高于DC组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 通过多因素logistic回归分析显示MSI-L+MSS、BRAF突变型是影响疗效的独立因素 ($P < 0.05$), 而KRAS状态与疗效无明显关系 ($P > 0.05$)。结论 晚期结肠癌患者组织的MSI、BRAF状态与使用贝伐珠单抗联合化疗方案的疗效密切相关, 可作为临床指导用药的重要指标。

【Abstract】Objective: To analyze the status of microsatellite instability (MSI), proto-oncogene (KRAS) and serine/threonine kinase (BRAF) in patients with advanced left-sided and right-sided colon cancer, and investigate their correlation with the curative effect of bevacizumab combined with chemotherapy. Methods: The clinical data of 80 patients with advanced colon cancer who were treated with bevacizumab combined with chemotherapy in the hospital from January 2018 to December 2021 were retrospectively collected. The patients were divided into disease control (DC) group (57 cases) and disease progression (PD) group (23 cases) according to the curative effect after 4 cycles of chemotherapy. Comparison was made between the two groups in terms of gender, age, Karnofsky performance status (KPS) score, pathological type, tumor location, and the status of MSI, KRAS and BRAF. The relationship between the status of MSI, KRAS and BRAF and the curative effect was analyzed. Results: There was no significant difference in gender, age, KPS score, pathological type, tumor location or KRAS status between the DC group and the PD group ($P > 0.05$). The proportions of MSI-L+MSS and mutant-type BRAF in the PD group were higher than those in the DC group ($P < 0.05$). Multivariate logistic regression analysis showed that MSI-L+MSS and mutant-type BRAF were independent factors affecting the curative effect ($P < 0.05$), while there was no relationship between KRAS status and curative effect ($P > 0.05$). Conclusion: The status of MSI and BRAF in patients with advanced colon cancer is closely related to the curative effect of bevacizumab combined with chemotherapy. They are helpful for clinical medication.

【关键词】晚期结肠癌; MSI; KRAS; BRAF; 疗效; 相关性

【Key words】Advanced colon cancer; MSI; KRAS; BRAF; Curative effect; Correlation

结肠癌是临床上常见的消化道恶性肿瘤之一, 随着社会经济水平的提高、饮食结构的改变及人口老龄化的加剧, 诸多因素导致我国结肠癌发病率和死亡率逐年上升^[1]。结肠癌早期症状多无显著特异性, 一旦确诊多为中晚期, 而对于

晚期结肠癌患者, 临床上大多使用综合治疗方式, 主要包括化疗、放疗、靶向治疗等^[2], 但预后较差、5年生存率较低^[3]。根据发病部位及临床表现的不同, 可将结肠癌分为左半结肠癌 (LSCC) 和右半结肠癌 (RSCC), LSCC 和 RSCC 在组织形态学、分子生物学、药物敏感性等方面存在着明显差异^[4]。目前, 转移性结直肠癌的一线化疗方案为 FOLFOX 或 FOLFIRI 方案^[5]。据文献报道, 微卫星 (MS) 的稳定情况与肿瘤发生密切相关^[6], 肿瘤发生时可能存在微卫星不稳定 (MSI) 和微卫星稳定 (MSS) 的不同情况。另外, 发现结直肠癌的发生与许多重要抑癌基因的突变相关, 如原癌基因 (KRAS)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (BRAF) 等^[7]。基于此, 本研究通过回顾性分析晚期左右半结肠癌患者的 MSI、KRAS、BRAF 状态, 研究其与贝伐珠单抗联合化疗疗效的相关性, 以期临床选择更加精准的治疗方案提供一定的参考。

作者简介: 吴婷, (1984.01), 女, 汉族, 南平, 硕士, 副主任医师, 胃肠道肿瘤。

王燕, 1982.07.03, 女, 汉族, 南平, 硕士, 副主任医师, 胃肠道肿瘤。

涂剑楠, 1989.12.10, 女, 汉族, 南平, 硕士, 主治医师, 胃肠道肿瘤。

通讯作者: 陈声池, 1967.03.01, 男, 汉族, 南平, 学士, 主任医师, 中医学。

项目名称: MSI、KRAS、BRAF 状态在晚期左右半结肠癌疗效差异

项目编号: 2018QH1176

1 资料与方法

1.1 一般资料

回顾性收集 2018 年 1 月~2021 年 12 月我院收治的 80 例晚期结肠癌患者作为研究对象。纳入标准：(1)符合第八版《AJCC 肿瘤分期手册》^[9]中关于晚期结肠癌的诊断及分期标准，临床分期均为 IV 期，且不可手术的患者；(2)年龄范围 18~70 岁；(3)未患有其他类型恶性肿瘤；(4)经影像学检查发现，可测量病灶不得少于一个；(5)健康状况 (ECOG) 评分 ≤ 2 分，无化疗及靶向治疗禁忌证；(6)经实验室检查，凝血及肝肾功能检测结果未见明显异常；(7)对于本研究中的治疗方案，至少可耐受 3 个周期。排除标准：(1)患有可能影响疗效的严重系统性疾病；(2)精神及意识障碍；(3)严重高血压未控制；(4)依从性差，无法规律接受治疗及评估疗效；(5)合并有凝血功能异常或出血可能患者；(6)存在肾功能异常疾病；(7)中枢神经系统转移；(8)存在其他靶向或化疗禁忌症。

1.2 方法

(1)从电子病历系统中导出患者年龄、性别、病理分型、肿瘤部位等临床资料；

(2)观察指标 ①MSI^[9]：选取结肠癌病变组织蜡块进行切片脱蜡，同时选择正常人体组织用以对照，在使用苏木素-伊红染色后，置于显微镜下观察病变组织，刮取细胞后离心取 DNA，通过使用 MSI 检测试剂扩增结肠癌组织中 5 个标准位点 MSI 的突变状态，若组织中存在的突变位点 ≥ 2 个，判定为高频微卫星不稳定型 (MSI-H)；若突变位点为 1 个，判定为低频微卫星不稳定型 (MSI-L)；若无突变位点，判定为 MSS。②KRAS、BRAF：将石蜡包埋的晚期结肠癌组织切成片，放入 EP 管中提取 DNA，使用基因突变联合检测试剂盒进行操作。制备样本和 PCR 扩增，在 PCR 反应中设立对照组，共同进行检测和分析。根据有无突变可分为 KRAS、BRAF 突变型和野生型。试剂盒均由厦门丽宝生物有限公司提供。

(3)治疗方案 予贝伐珠单抗[Roche Pharma (Schweiz) AG, 国药准字 SJ20170035]静脉滴注，使用剂量为 5mg/kg，

隔周 1 次。FOLFOX 方案具体如下：将奥沙利铂 (齐鲁制药 [海南]有限公司，国药准字 H20093167, 50mg) 85mg/m²+亚叶酸钙 (山东罗欣药业集团有限公司, 国药准字 H20054302, 100mg) 400mg/m²+氟尿嘧啶 (天津金耀药业有限公司生产, 国药准字 H12020959, 0.25g/10ml) 2400mg/m²持续泵注 46h, 以 14d 为 1 个周期。FOLFIRI 方案具体如下：予伊立替康 (江苏恒瑞医药股份有限公司, 国药准字 H20061276) 替换奥沙利铂，使用剂量为 180mg/m²，在第 1 天治疗时，静滴治疗约 90min；此方案中其他药物与 FOLFOX 方案大致相同。同样以 14d 为 1 个周期。在第 3 周期化疗结束后，对两组患者均予影像学检查以评估疗效。

(4)疗效判定 按实体瘤疗效评价标准 RECIST 1.1 版^[10]评价疗效，具体如下，完全缓解 (CR)：所有靶病灶均消失，且至少持续 4 周以上；部分缓解 (PR)：所有可测量靶病灶的最大长径之和较前减少 30% 以上；疾病稳定 (SD)：所有可测量靶病灶的最大长径之和减少不超过 30%，但直径和相对增加少于 20%；疾病进展 (PD)：所有可测量靶病灶直径之和相对增加不少于 20% (直径和绝对增加不少于 5mm, 出现的新病灶不少于 1 个)。根据疗效可将患者分为两组，其中一组为疾病控制组 (DC 组 = 57 例)：CR+PR+SD, 另一组为疾病进展组 (PD 组 = 23 例)：PD。

1.3 统计学处理

将所得数据导入统计学软件 SPSS23.0 进行分析，计量资料如年龄、功能状态 (KPS) 评分，以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，比较用单因素方差分析或 t 检验；计数资料如性别、病理分型、肿瘤部位及 MSI、KRAS、BRAF 状态，以率 (%) 表示，比较用 χ^2 检验。使用多因素 Logistic 回归分析 MSI、KRAS、BRAF 状态与疗效的关系，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MSI、KRAS、BRAF 状态与病理特征的关系

比较患者不同 MSI、KRAS、BRAF 状态的病理特征，无显著性差异 ($P > 0.05$)，见表 1。

表 1 不同 MSI、KRAS、BRAF 状态病理特征比较 [例 (%)]

| 项目 | 例数 | MSI 状态 | | KRAS 状态 | | BRAF 状态 | |
|-----------|----|-----------|------------|------------|------------|-----------|------------|
| | | MSI-H | MSI-L+MSS | 突变型 | 野生型 | 突变型 | 野生型 |
| 性别 | | | | | | | |
| 男 | 45 | 8 (61.54) | 37 (55.22) | 11 (44.00) | 34 (61.82) | 5 (55.56) | 40 (56.34) |
| 女 | 35 | 5 (38.46) | 30 (44.78) | 14 (56.00) | 21 (38.18) | 4 (44.44) | 31 (43.66) |
| 年龄 (岁) | | | | | | | |
| < 60 | 38 | 9 (69.23) | 29 (43.28) | 10 (40.00) | 28 (50.91) | 6 (66.67) | 32 (45.07) |
| ≥ 60 | 42 | 4 (30.77) | 38 (56.72) | 15 (60.00) | 27 (49.09) | 3 (33.33) | 39 (54.93) |
| 病理分型 | | | | | | | |
| 高分化腺癌 | 22 | 3 (23.08) | 19 (28.36) | 7 (28.00) | 15 (27.27) | 2 (22.22) | 20 (28.17) |
| 中分化腺癌 | 27 | 5 (38.46) | 22 (32.84) | 9 (36.00) | 18 (32.73) | 3 (33.33) | 24 (33.80) |
| 低分化腺癌 | 19 | 4 (30.77) | 15 (22.39) | 5 (20.00) | 14 (25.45) | 1 (11.11) | 18 (25.35) |
| 黏液腺癌 | 12 | 1 (7.69) | 11 (16.41) | 4 (16.00) | 8 (14.55) | 3 (33.33) | 9 (12.68) |
| 肿瘤部位 | | | | | | | |
| 左侧 | 46 | 7 (53.85) | 39 (58.21) | 15 (60.00) | 31 (56.36) | 4 (44.44) | 42 (59.15) |
| 右侧 | 34 | 6 (46.15) | 28 (41.79) | 10 (40.00) | 24 (43.64) | 5 (55.56) | 29 (40.85) |

2.2 DC组与PD组相关因素比较

比较DC组与PD组相关因素,如性别、年龄、KPS评分、病理分型、病变部位、KRAS状态方面,差异无统计学

意义($P > 0.05$);但PD组的MSI-L+MSS、BRAF突变型占比高于DC组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 两组患者相关因素比较[$\bar{x} \pm s$, 例(%)]

| 项目 | DC组(n=57) | PD组(n=23) | t/ χ^2 | P |
|------------------|--------------|--------------|-------------|-------|
| 性别 | | | 3.429 | 0.064 |
| 男 | 30(52.63) | 15(65.22) | | |
| 女 | 27(47.37) | 8(34.78) | | |
| 年龄(岁) | 56.28 ± 7.14 | 58.19 ± 7.32 | 1.075 | 0.286 |
| KPS评分(分) | 76.43 ± 3.12 | 77.08 ± 3.15 | 0.841 | 0.403 |
| 病理分型 | | | 0.597 | 0.897 |
| 高分化腺癌 | 17(29.82) | 5(21.74) | | |
| 中分化腺癌 | 19(33.33) | 8(34.78) | | |
| 低分化腺癌 | 13(22.81) | 6(26.09) | | |
| 黏液腺癌 | 8(14.04) | 4(17.39) | | |
| 病变部位 | | | 3.103 | 0.078 |
| 左侧 | 32(56.14) | 14(60.87) | | |
| 右侧 | 25(43.86) | 9(39.13) | | |
| MSI状态 | | | 3.919 | 0.048 |
| MSI-H | 11(19.30) | 2(8.70) | | |
| MSI-L+MSS | 46(80.70) | 21(91.30) | | |
| KRAS状态 | | | 0.401 | 0.527 |
| 突变型* | 19(33.33) | 6(26.09) | | |
| 野生型 | 38(66.67) | 17(73.91) | | |
| BRAF状态 | | | 7.117 | 0.008 |
| 突变型 [#] | 3(5.26) | 6(26.09) | | |
| 野生型 | 54(94.74) | 17(73.91) | | |

注: *共25例,其中突变基因位点G12C 3例、G12S 5例、G12V 2例、G12D 4例、G13R 3例、Q61K 2例、Q61L 3例、Q61R 1例、Q61H 2例; [#]共9例,均为V600E点突变。

表3 影响疗效的多因素 logistic 回归分析

| 因素 | β | SE | Wald | OR | P | 95% CI |
|-------------|---------|-------|--------|-------|--------|-------------|
| MSI-L+MSS | 0.476 | 0.128 | 13.829 | 1.610 | <0.001 | 1.252~2.069 |
| KRAS 野生型 | 0.972 | 0.516 | 3.548 | 2.643 | 0.060 | 0.961~7.267 |
| BRAF 突变型 | 0.863 | 0.257 | 11.276 | 2.370 | 0.001 | 1.432~3.922 |

2.2 MSI、KRAS、BRAF状态与疗效的关系分析

运用 logistic 回归分析影响疗效的差异变量,根据实际情况赋值,以疗效为因变量(DC为0,PD为1),以单因素分析具有统计学意义的因素为自变量进行赋值(MSI-H为0,MSI-L+MSS为1;KRAS突变型为0,野生型为1;BRAF野生型为0,突变型为1),多因素 logistic 回归分析显示MSI-L+MSS、BRAF野生型是影响疗效的独立因素($P < 0.05$),见表3。

3 结论

在以往临床治疗中,晚期结肠癌可出现高复发率、低有效率等情况^[1],严重影响了患者的生存质量。近年来,关于肿瘤细胞信号传导方式的研究取得了明显进步,因此,内科治疗肿瘤的重心转向分子靶向治疗,主要包括肿瘤细胞受

体、信号传导以及血管生成等方面。血管内皮生长因子(VEGF)是在肿瘤血管生长过程中具有调控作用的一种细胞因子^[2],通过与内皮细胞表面受体结合,促进肿瘤新生血管的形成。作为一种重组人源化单克隆抗体,贝伐珠单抗具有抗VEGF的特性,可阻断VEGF与其受体的有效结合,内皮细胞的分裂活性被抑制,新生血管大幅度减少,遏制原发肿瘤增殖,阻止其侵袭进入脉管系统而产生转移灶,最终实现抗肿瘤的目的。本研究将贝伐珠单抗联合一线化疗方案应用于晚期结肠癌患者,观察其疗效,并分析、探讨患者肿瘤组织的MSI、KRAS、BRAF状态分别与疗效的关系。

本研究中通过比较DC组与PD组的相关因素发现,在性别、年龄、KPS评分、病理分型、肿瘤部位、KRAS状态方面($P > 0.05$),具有可比性,但PD组的MSI-L+MSS、BRAF突变型占比高于DC组,差异有统计学意义($P < 0.05$),说明晚期结肠癌患者的MSI、BRAF状态可对贝伐珠单抗联合化疗的效果产生一定影响。徐蕾^[3]等研究发现,对于给予贝

伐珠单抗联合一线化疗治疗的晚期结直肠癌患者, KRAS 基因突变状态与疗效之间尚无明确联系, 与本研究结果类似。MS 又被称为简单重复序列, 广泛存在于基因组, 近年来作为肿瘤标志物及预后的影响因子被大量研究, 而 MSI 最早被发现与结直肠癌中, 不少学者认为 MSI 与结直肠癌的预后密切相关^[14], 可指导临床用药。周乐其^[15]等认为相较于 MSI-H 状态的中晚期结直肠癌患者, MSI-L+MSS 状态患者一线治疗的疗效明显更差。本研究通过分析、探讨, 初步拟定了晚期结直肠癌患者 MSI 状态对贝伐珠单抗联合化疗效果的影响。另外, 陈海霞^[16]等研究发现, 结直肠癌患者中 BRAF 基因突变型与野生型相比, 更易出现预后不良。

本研究经多因素 logistic 回归分析发现, MSI-L+MSS、BRAF 野生型是影响贝伐珠单抗联合化疗效果的独立因素 ($P < 0.05$)。有文献显示^[17], 针对 II/III 期结直肠癌患者, MSI-L+MSS 状态患者的总生存期及无病生存期明显少于 MSI-H 状态患者, 预后相对较差。罗长顺^[18]等研究发现, MSS 状态直肠癌患者体内程序性死亡受体配体 1 (PD-L1)

在肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 中的阳性比例明显低于 MSI-H 状态患者, 而 PD-L1 在 TIL 细胞内的阳性表达是影响患者临床疗效的重要因素。与杨迁妮^[19]等人的意见相悖, 他们认为 MSI-H 晚期结直肠癌患者 3 年生存率低于 MSS 型者, 可能与 MSI-H 晚期结直肠癌患者化疗的有效率低相关, 但因本研究 MSI-H 结直肠癌的样本量相对较少, 且可能与化疗方案相关。何兴状^[20]等证实 BRAF V600E 突变是影响结肠癌患者预后的独立危险因素, 验证了本研究结果。

综上所述, 本研究发现晚期结肠癌患者组织的 MSI、BRAF 状态, 与使用贝伐珠单抗联合化疗方案的疗效密切相关, 可作为临床指导用药的重要指标, 提高疾病控制率。但由于此次为单中心临床队列, 存在一定的选择局限性, 且样本量偏小, 本研究仅发现 13 例 MSI-H 及 9 例 BRAF 突变型患者, 随访时间短, 相关结论及 MSI、BRAF 状态与患者远期预后的关系仍需扩大样本量行进一步研究, 以阐明与上述基因相关的分子机制。

参考文献

- [1]田传鑫,赵磊.结直肠癌及结直肠癌肝转移流行病学特点[J].中华肿瘤防治杂志,2021,28(13):1033-1038.
- [2]白雪杉,林国乐.2019.V1 版《NCCN 结直肠癌诊治指南》更新要点解析[J].中国全科医学,2019,22(33):4031-4034.
- [3]袁世超,吴贵阳,徐丹红.结肠癌组织中微 RNA-26b 和 Unc-51 自噬激活酶-2 表达水平与临床病理特征及预后的关系[J].中国药物与临床,2019,19(10):1589-1591.
- [4]许开宇,连正杰,伍江平,等. MMP-3 mRNA 在左、右半结肠癌组织中的表达及其与患者临床病理参数和预后的关系[J]. 山东医药,2016,56(24):1-4.
- [5]陈皓,秦军伟(综述),韩宇(审校).FOLFOXIRI 方案一线治疗晚期结直肠癌的研究进展[J].中国肿瘤临床,2021,48(11):587-592.
- [6]中国临床肿瘤学会结直肠癌专业委员会, 中国抗癌协会大肠癌专业委员会遗传学组, 中国医师协会结直肠肿瘤专业委员会遗传专委会. 结直肠癌及其他相关实体瘤微卫星不稳定性检测中国专家共识[J]. 中华肿瘤杂志, 2019, 041(10):734-741.
- [7]白杨,吴林林,安建多,等.结直肠癌组织中 KRAS、NRAS、BRAF、PIK3CA 基因突变与临床病理特征及 MMR 蛋白、p53 蛋白表达的相关性研究[J].诊断病理学杂志,2021,28(3):183-188+193.
- [8]刘荫华,姚宏伟,周斌,等.美国肿瘤联合会结直肠癌分期系统(第 8 版)更新解读[J].中国实用外科杂志,2017,37(1):6-9.
- [9]陈渝宏,杨彪(综述),廖正银(审校).免疫治疗相关生物标志物在消化道肿瘤中的应用[J].中国肿瘤临床,2022,49(12):631-635.
- [10]张萍,艾斌.实体瘤免疫治疗疗效评价标准[J].国际肿瘤学杂志,2016,43(11):848-851.
- [11]张洋,吴慧丽.不同方案对老年晚期结肠癌血清 CEA、AFP、CA19-9、TK1 水平及生存周期影响的对比[J].中国医院药学杂志,2019,39(3):269-273.
- [12]李斌,赵冬,黄蓉,郭娟.骨髓血管内皮生长因子水平在弥漫性大 B 细胞淋巴瘤疗效监测中的价值[J].检验医学,2021,36(5):480-485.
- [13]徐蕾,邢丽,李明,等.KRAS 基因状态对晚期结直肠癌一线化疗联合贝伐珠单抗疗效的预测价值[J].蚌埠医学院学报,2019,44(5):593-596.
- [14]郑超,王玻玮,才层,等.结直肠癌组织 MSI 状态及其与临床病理参数之间的相关性[J].现代肿瘤医学,2021,29(17):3053-3056.
- [15]周乐其,于冠宇,沈钰新,等.程序性死亡蛋白-1 抑制剂联合新辅助化疗治疗微卫星稳定极低位直肠癌的安全性及其疗效[J].中华胃肠外科杂志,2022,25(3):250-256.
- [16]陈海霞,何亚楠,王维娜,等.结直肠癌组织中 KRAS 和 BRAF 基因突变与临床病理特征及预后的关系[J].现代肿瘤医学,2021,29(04):626-631.
- [17]王丽,毛海燕,童建东,等.错配修复/微卫星不稳定性对晚期结直肠癌化疗敏感性及其预后的影响[J].中国医药导报,2019,16(8):108-111+127.
- [18]罗长顺,刘坤,汪黎明.肿瘤微环境相关因子与直肠癌新辅助化疗效果及微卫星稳定状况的关系[J].癌症进展,2020,18(10):1031-1034.
- [19]杨迁妮,韩晓栋,白威.微卫星不稳定状态在晚期结直肠癌患者中的临床应用价值[J].中国药物与临床,2019,19(10):1690-1692.
- [20]何兴状,杨正斌,牟辉.BRAF V600E 基因突变和微卫星不稳定性与中晚期结直肠癌患者预后的相关性分析[J].医学临床研究,2019,36(8):1507-1509.