

• 论 著 •

结直肠癌微卫星不稳定状态与 KRAS、NRAS、BRAF 基因突变和临床病理特征及预后的关系*

赵勇强¹, 王媛媛^{1△}, 刘春鹏¹, 詹晓芬¹, 魏巍然¹, 古家美²

1. 汕头市中心医院病理科, 广东汕头 515031; 2. 中山大学肿瘤防治中心分子诊断科, 广东广州 510060

摘要:目的 探讨结直肠癌(CRC)的微卫星不稳定(MSI)状态与 KRAS、NRAS、BRAF 基因突变、临床病理特征及预后的相关性。方法 选取 2015 年 3 月至 2020 年 12 月于汕头市中心医院和中山大学肿瘤防治中心收治的经病理确诊为 CRC 的 861 例患者作为研究对象, 检测其 4 种错配修复(MMR)蛋白表达、MSI 状态、KRAS、NRAS、NRAS 基因突变情况。分析 MMR 蛋白表达、KRAS、NRAS 和 BRAF 基因突变与 CRC 患者临床病理特征的相关性, MMR 蛋白表达与 KRAS、NRAS 和 BRAF 基因突变的相关性, 并采用 COX 回归模型探讨 CRC 患者 2 年内死亡的独立影响因素。结果 CRC 中的 MMR 蛋白表达总缺失率为 12.08%, KRAS 基因突变率为 42.28%, NRAS 基因突变率为 2.21%, BRAF 基因突变率为 6.50%。不同年龄、肿瘤部位、组织学类型、肿瘤最大径、分化程度、TNM 分期、淋巴结转移状态、CEA 水平的患者 MMR 蛋白表达比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。不同性别、肿瘤部位、组织学类型、分化程度、TNM 分期、淋巴结转移状态、CA199 水平的患者 KRAS 基因突变比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。不同 CEA 水平的患者 NRAS 基因突变比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。不同肿瘤部位、组织学类型、肿瘤最大径、分化程度、TNM 分期、淋巴结转移状态的患者 BRAF 基因突变比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。MMR 蛋白表达与 KRAS 基因突变呈负相关($r = -0.137, P < 0.001$)。MMR 蛋白表达与 NRAS 基因突变不相关($r = -0.007, P = 0.834$)。MMR 蛋白表达与 BRAF 基因突变呈正相关($r = 0.162, P < 0.001$)。淋巴结转移、KRAS 突变、BRAF 突变、MSI-H 是 CRC 患者 2 年内死亡的独立影响因素。结论 MSI 状态、KRAS、NRAS、BRAF 基因突变与 CRC 的临床病理特征具有相关性, 上述指标的检测有助于 CRC 的生物学行为分析及预后判断。

关键词: 结直肠癌; 微卫星不稳定; KRAS; NRAS; BRAF; 病理特征

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2024.08.015 中图法分类号: R735.3; R446.8

文章编号: 1673-4130(2024)08-0969-07

文献标志码: A

Relationship between microsatellite instability and KRAS, NRAS, BRAF gene mutations, clinical pathological features, and prognosis in colorectal cancer*

ZHAO Yongqiang¹, WANG Yuanyuan^{1△}, LIU Chunpeng¹, ZHAN Xiaofen¹, WEI Weiran¹, GU Jiamei²

1. Department of Pathology, Shantou Central Hospital, Shantou, Guangdong 515031, China;

2. Department of Molecular Diagnosis, Sun Yat-sen University Cancer Center, Guangzhou, Guangdong 510060, China

Abstract: Objective To explore the relationship between microsatellite instability (MSI) status and KRAS, NRAS, BRAF gene mutations, clinicopathologic features and prognosis in colorectal cancer (CRC). **Methods** A total of 861 patients diagnosed with CRC by pathology admitted to Shantou Central Hospital and Sun Yat-sen University Cancer Center from March 2015 to December 2020 were selected as the study objects to detect the expression of 4 mismatch repair (MMR) proteins, MSI status, and gene mutations of KRAS, NRAS, and NRAS. The correlation between MMR protein expression, KRAS, NRAS and BRAF gene mutations and clinicopathological features of CRC patients was analyzed, and the correlation between MMR protein expression and KRAS, NRAS and BRAF gene mutations were analyzed. The independent influencing factors of mortality in CRC patients within two years were analyzed by COX regression model. **Results** The total deletion rate of MMR protein expression in CRC was 12.08%, the mutation rate of KRAS gene was 42.28%, the mutation rate of NRAS gene was 2.21%, and the mutation rate of BRAF gene was 6.50%. There were significant differences in MMR protein expression among patients with different age, tumor site, histological type,

* 基金项目: 汕头市科技计划医疗卫生类别项目(汕府科[2020]5号-39)。

作者简介: 赵勇强, 男, 主治医师, 主要从事病理学临床研究。△ 通信作者, E-mail: Cpci156776A@163.com。

tumor maximum diameter, differentiation degree, TNM stage, lymph node metastasis status and CEA level ($P<0.05$). There were significant differences in KRAS gene mutation among patients with different sex, tumor site, histological type, differentiation degree, TNM stage, lymph node metastasis status and CA199 level ($P<0.05$). The difference of NRAS gene mutation in patients with different CEA levels was statistically significant ($P<0.05$). There were significant differences in BRAF gene mutation among patients with different tumor sites, histological types, tumor maximum diameter, differentiation degree, TNM stage and lymph node metastasis status ($P<0.05$). MMR protein expression was negatively correlated with KRAS gene mutation ($r=-0.137, P<0.001$). There was no correlation between MMR protein expression and NRAS gene mutation ($r=-0.007, P=0.834$). The expression of MMR protein was positively correlated with BRAF gene mutation ($r=0.162, P<0.001$). Lymph node metastasis, KRAS mutation, BRAF mutation, and MSI-H were independent factors for 2-year death in CRC patients. **Conclusion** MSI status, KRAS, NRAS, BRAF gene mutations are correlated with the clinical pathological characteristics of CRC. The detection of these indicators is helpful for the biological behavior analysis and prognosis judgment of CRC.

Key words: colorectal cancer; microsatellite instability; KRAS; NRAS; BRAF; pathological characteristics

研究发现,结直肠癌(CRC)在欧美国家的发病率居内脏肿瘤的第2位^[1]。在我国,CRC的发病率呈逐年上升趋势,且危害较大^[2]。病因学上认为遗传因素在CRC的发生发展过程中起到了关键作用,遗传易感性范围从明确的遗传综合征到不明确的家族性集合体,其分子遗传机制较为复杂。GAO等^[3]和米迷等^[4]研究认为,CRC的进展有两种途径:其一是染色体不稳定性(CIN)通路,即EGFR-KRAS/BRAF-MEK-ERK-MAPK通路上的基因突变;其二是微卫星不稳定性(MSI),即DNA错配修复(MMR)功能异常而造成的生物学状态。CRC的发生发展是多基因、多通路共同参与的复杂过程^[5]。然而,目前鲜有针对MSI状态、CIN通路上的RAS/BRAF基因突变、患者的临床病理特征及预后相关性的研究。本研究旨在通过对CRC重要生物学行为和临床病理特征的探讨,为其精准个体化治疗与预后提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2015年3月至2020年12月于汕头市中心医院和中山大学肿瘤防治中心就诊,经病理检查确诊为CRC的861例患者的临床标本。861例CRC患者中男498例,女363例;年龄31~80岁,平均(56.78±12.62)岁。入选标准:(1)病理检查明确为原发性CRC;(2)无其他肿瘤诊断史;(3)无放化疗、内分泌治疗、激素治疗和靶向治疗史;(4)依从性好。排除标准:(1)妊娠或哺乳期女性;(2)伴严重未控制的内科疾病和急性传染病。CRC诊断依据2020年第5版世界卫生组织(WHO)结直肠肿瘤组织学分类标准^[6],CRC分期依据为2017年AJCC第8版TNM分期标准^[7]。本研究获得汕头市中心医院和中山大学肿瘤防治中心医学伦理委员会批准(审批号:2019-科研-121号)和患者的知情同意。

1.2 仪器与试剂 Titan S全自动免疫组化染色机、MMR检测试剂盒均购自福州迈新生物技术开发有限

公司。KRAS、NRAS和BRAF基因突变检测试剂盒均购自北京雅康博生物科技有限公司。MSI检测试剂、ABI 7500实时荧光定量PCR仪均购自美国应用生物系统公司。

1.3 方法

1.3.1 CRC组织的苏木素-伊红(HE)染色 常规石蜡组织切片的HE染色参考文献[8]完成。

1.3.2 MMR蛋白检测及判定标准 检测流程:按照MLH1(1:150)、MSH2(1:100)、MSH6(1:150)和PMS2(1:150)的一抗稀释比例完成MMR蛋白检测。结果判定标准^[9]:切片中肿瘤细胞核见黄色或棕黄色着色,且无背景染色。阴性染色结果:肿瘤细胞核未见黄色或棕黄色着色。MMR蛋白(MLH1、MSH2、MSH6和PMS2)中有1种以上蛋白染色结果为阴性,则判定为错配修复缺陷(dMMR),对应于高频度微卫星不稳定(MSI-H)。4种蛋白均表现为阳性时判定为错配修复完善(pMMR),对应于低频度微卫星不稳定(MSI-L)或微卫星稳定(MSS)。

1.3.3 MSI检测及判定标准 检测流程:提取组织DNA,完成引物的稀释及存放。配制PCR反应体系、加样、上机检测。检测结果判读,参阅文献[10]:本试剂盒检测位点包括D5S346、BAT26、BAT25、D17S250、D2S123。与配对正常组织相比较,检测的全部微卫星不稳定性位点均无等位基因的移动或异常等位基因出现,定义为MSS。与配对正常组织相比较呈现波峰的移动或数目改变,定义为MSI,微卫星5个位点中2个以及2个以上位点出现不稳定者为MSI-H;只有1位点出现不稳定时为MSI-L。

1.3.4 KRAS、NRAS、BRAF基因突变的检测及判定标准 KRAS、NRAS、BRAF基因检测流程及检测结果判读参阅文献[11]。若待检DNA样品中突变位点检测无扩增或Ct值≥39,则判定为阴性;若待检DNA样品中有至少一个突变位点检测有扩增且Ct

值<39,则计算该突变位点 ΔCt 值。若该突变位点 ΔCt 值<cut-off 值,则判定为阳性。

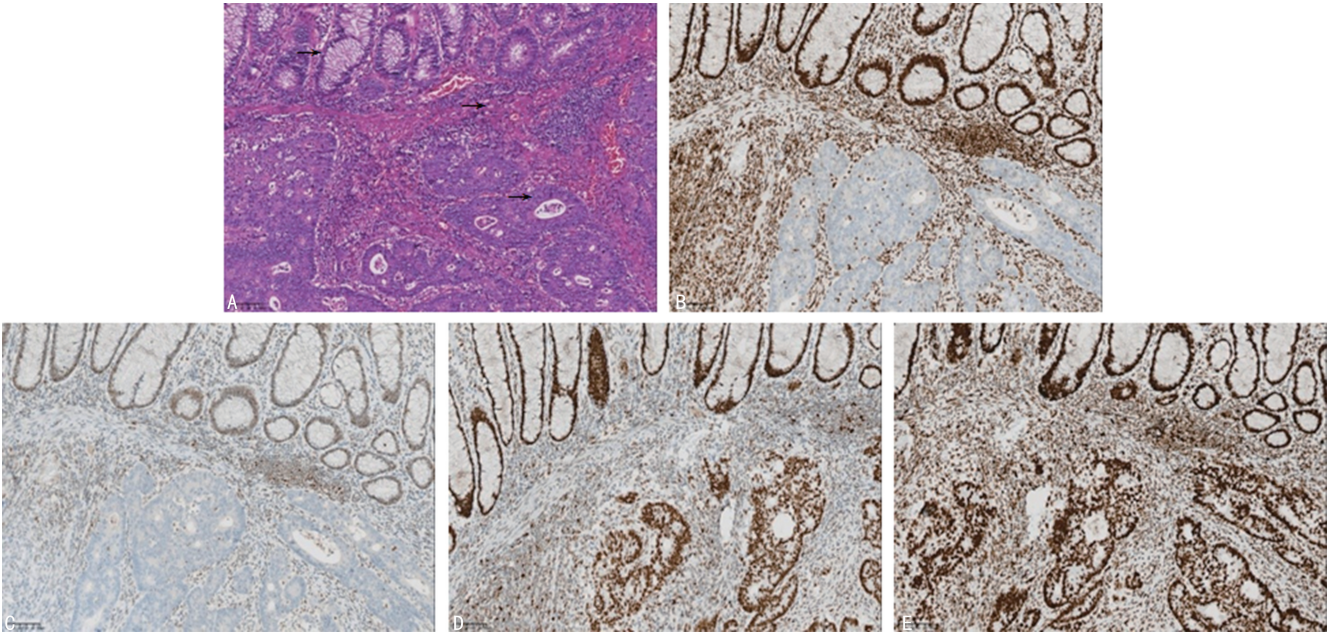
1.3.5 癌胚抗原(CEA)、糖类抗原 199(CA199)的检测及判定标准 检测流程:参阅文献[12]。结果判读:CEA 的参考值为 0.0~4.7 ng/mL、CA199 的参考值为 0~27 U/mL。大于参考值,则判定为阳性;否则视为阴性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS26.0 软件进行数据分析。计数资料以频数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率检验。相关性分析用 Spearman 等级相关。符合率是指 2 种检测结果均为

MSI-H(MSS 的标本数之和)占总标本数的比例。生存时间先进行正态分布检验,符合正态分布则以 $\bar{x}\pm s$ 表示;非正态性分布则以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示。CRC 患者 2 年内死亡影响因素分析采用 COX 回归模型 Enter 法(全变量模型)。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 结肠癌的 HE 染色及 MMR 蛋白染色 伴微卫星不稳定性的结肠腺癌,HE 染色显示伴随淋巴细胞浸润。IHC 染色显示肿瘤缺乏 MLH1 和 PMS2 蛋白的表达。见图 1。



注:A 为结肠腺癌的 HE 染色(上方箭头为正常的肠黏膜,下方箭头为结肠腺癌,中间箭头为间质淋巴细胞);B 为结肠腺癌的 MLH1 蛋白呈阴性表达;C 为结肠腺癌的 PMS2 蛋白呈阴性表达;D 为结肠腺癌的 MSH2 蛋白呈阳性表达;E 为结肠腺癌的 MSH6 蛋白呈阳性表达。

图 1 结肠癌的 HE 染色及 MMR 蛋白染色结果($\times 200$)

2.2 CRC 的 MMR 蛋白表达缺失情况 CRC 中的 MMR 蛋白表达总缺失率为 12.08%(104/861)。104 例 CRC 中的 MMR 蛋白表达缺失类型:MLH1 + PMS2 缺失率为 54.81%(57/104),MSH2 + MSH6 缺失率为 21.15%(22/104),PMS2 缺失率为 8.65%(9/104),MSH2 缺失率为 5.77%(6/104),MSH6 缺失率为 9.62%(10/104)。

2.3 KRAS、NRAS 和 BRAF 基因在 CRC 标本的突变情况 KRAS 基因突变率为 42.28%(364/861),NRAS 基因突变率为 2.21%(19/861),BRAF 基因突变率为 6.50%(56/861),3 种基因检出的相应密码子、碱基变化、氨基酸变化和突变例数及构成比见表 1。

2.4 MMR 蛋白表达及 KRAS、NRAS 和 BRAF 基因突变与 CRC 患者临床病理特征的关系 不同年龄、肿瘤部位、组织学类型、肿瘤最大径、分化程度、TNM 分期、淋巴结转移状态、CEA 水平的患者 MMR

蛋白表达比较,差异有统计学意义($P<0.05$);不同性别、肿瘤浸润深度、CA199 水平的患者 MMR 蛋白表达比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。不同性别、肿瘤部位、组织学类型、分化程度、TNM 分期、淋巴结转移状态、CA199 水平的患者 KRAS 基因突变比较,差异有统计学意义($P<0.05$);不同患者年龄、肿瘤最大径、浸润深度、CEA 水平的患者 KRAS 基因突变比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。不同 CEA 水平的患者 NRAS 基因突变比较,差异有统计学意义($P<0.05$);不同患者性别、年龄、肿瘤部位、组织学类型、肿瘤最大径、分化程度、TNM 分期、浸润深度、淋巴结转移状态、CA199 水平的患者 NRAS 基因突变比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。不同肿瘤部位、组织学类型、肿瘤最大径、分化程度、TNM 分期、淋巴结转移状态的患者 BRAF 基因突变比较,差异有统计学意义($P<0.05$);不同患者性别、年龄、浸润深度、CEA 水平、CA199 水平的患者 BRAF 基因突变比较,差异

无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

2.5 MMR 蛋白表达与 KRAS、NRAS 和 BRAF 基因突变的相关性 KRAS 基因在 MSI 的 CRC 突变率 24.04%(25/104)低于 MSS 的 CRC 突变率 44.78%(339/757),MMR 蛋白表达与 KRAS 基因突变呈负相关($r=-0.137,P<0.001$)。NRAS 基因在 MSI 的 CRC 突变率 1.92%(2/104)低于 MSS 的 CRC 突变率 2.25%(17/757),但是 MMR 蛋白表达与 NRAS 基因突变不相关($r=-0.007,P=0.834$)。BRAF 基因在 MSI 的 CRC 突变率 17.31%(18/104)高于 MSS 的 CRC 突变率 5.02%(38/757),MMR 蛋白表达与 BRAF 基因突变呈正相关($r=0.162,P<0.001$)。

2.6 CRC 患者两年内死亡影响因素的 COX 回归模型 截至 2022 年 12 月 31 日,有 4.53%(39/861)的 CRC 患者失访。随访患者中,70.07%(576/822)的患者于 2 年内死亡,生存时间为 588.30(455.60,746.00)d。通过 Kaplan-Meier 生存分析法对总生存期进行单因素分析,淋巴结转移、KRAS 突变、BRAF 突变、MSI-H 是 CRC 患者 2 年内死亡的影响因素($P<0.05$)。对单因素分析差异有统计学意义的因素进行 COX 回归分析,结果显示,淋巴结转移、KRAS

突变、BRAF 突变、MSI-H 是影响 CRC 患者 2 年内死亡的影响因素($P<0.05$)。见表 3。

表 1 KRAS、NRAS 和 BRAF 基因在 CRC 标本的突变情况

密码子	碱基变化	氨基酸变化	突变[n(%)]
KRAS			
12	35G>A	G12D	145(39.84)
12	35G>T	G12V	72(19.78)
12	34G>T	G12C	41(11.26)
12	35G>C	G12A	23(6.31)
12	34G>C	G12R	8(2.20)
12	34G>A	G12S	5(1.38)
13	38G>A	G13D	70(19.23)
NRAS			
12	35G>A	G12D	9(47.37)
12	34G>T	G12C	2(10.53)
12	34G>A	G12S	2(10.53)
13	37G>C	G13R	1(5.25)
61	182A>T	Q61L	3(15.79)
61	182A>G	Q61R	2(10.53)
BRAF			
600	GTG>GAG	V600E	56(100.00)

表 2 MMR 蛋白表达、KRAS、NRAS 和 BRAF 基因突变与 CRC 患者临床病理特征的关系[n(%)]

项目	n	MMR				KRAS			
		MSI-H	MSS	χ^2	P	野生型	突变型	χ^2	P
性别				1.191	0.275			24.647	<0.001
男	498	55(11.04)	443(88.96)			323(64.86)	175(35.14)		
女	363	49(13.50)	314(86.50)			174(47.93)	189(52.07)		
年龄(岁)				15.976	<0.001			1.209	0.272
≥50	663	64(9.65)	599(90.35)			376(56.71)	287(43.29)		
<50	198	40(20.20)	158(79.80)			121(61.11)	77(38.89)		
肿瘤部位				20.043	<0.001			12.08	0.002
左半结肠	305	19(6.23)	286(93.77)			195(63.93)	110(36.07)		
右半结肠	227	43(18.94)	184(81.06)			111(48.90)	116(51.10)		
直肠	329	42(12.77)	287(87.23)			191(58.05)	138(41.95)		
组织学类型				83.89	<0.001			31.932	<0.001
腺癌	698	50(7.16)	648(92.84)			435(62.32)	263(37.68)		
黏液腺癌	163	54(33.13)	109(66.87)			62(38.04)	101(61.96)		
肿瘤最大径(cm)				91.392	<0.001			0.388	0.824
≥5	151	53(35.10)	98(64.90)			87(57.62)	64(42.38)		
3~<5	536	38(7.09)	498(92.91)			306(57.09)	230(42.91)		
<3	174	13(7.47)	161(92.53)			104(59.77)	70(40.23)		
分化程度				68.124	<0.001			21.868	<0.001
高	95	36(37.89)	59(62.11)			34(35.79)	61(64.21)		
中	675	63(9.33)	612(90.67)			404(59.85)	271(40.15)		
低	91	5(5.49)	86(94.51)			59(64.84)	32(35.16)		
TNM 分期				13.918	<0.001			29.843	<0.001
I+Ⅱ期	474	75(15.82)	399(84.18)			313(66.03)	161(33.97)		

续表 2 MMR 蛋白表达、KRAS、NRAS 和 BRAF 基因突变与 CRC 患者临床病理特征的关系[*n*(%)]

项目	<i>n</i>	MMR				KRAS			
		MSI-H	MSS	χ^2	<i>P</i>	野生型	突变型	χ^2	<i>P</i>
Ⅲ+Ⅳ期	387	29(7.49)	358(92.51)			184(47.55)	203(52.45)		
浸润深度				0.846	0.358			0.178	0.673
T1+T2	125	12(9.60)	113(90.40)			70(56.00)	55(44.00)		
T3+T4	736	92(12.50)	644(87.50)			427(58.02)	309(41.98)		
淋巴结转移				15.079	<0.001			29.489	<0.001
无	485	77(15.88)	408(84.12)			319(65.77)	166(34.23)		
有	376	27(7.18)	349(92.82)			178(47.34)	198(52.66)		
CEA 水平				8.225	0.004			0.175	0.676
阳性	369	31(8.40)	338(91.60)			216(58.54)	153(41.46)		
阴性	492	73(14.84)	419(85.16)			281(57.11)	211(42.89)		
CA199 水平				0.243	0.622			15.844	<0.001
阳性	223	29(13.00)	194(87.00)			154(69.06)	69(30.94)		
阴性	638	75(11.76)	563(88.24)			343(53.76)	295(46.24)		

项目	<i>n</i>	NRAS				BRAF			
		野生型	突变型	χ^2	<i>P</i>	野生型	突变型	χ^2	<i>P</i>
性别				0.225	0.635			2.276	0.131
男	498	486(97.59)	12(2.41)			471(94.58)	27(5.42)		
女	363	356(98.07)	7(1.93)			334(92.01)	29(7.99)		
年龄(岁)				0.121	0.728			0.002	0.968
≥50	663	649(97.89)	14(2.11)			620(93.51)	43(6.49)		
< 50	198	193(97.47)	5(2.53)			185(93.43)	13(6.57)		
肿瘤部位				1.72	0.423			7.142	0.028
左半结肠	305	300(98.36)	5(1.64)			287(94.10)	18(5.90)		
右半结肠	227	223(98.24)	4(1.76)			204(89.87)	23(10.13)		
直肠	329	319(96.96)	10(3.04)			314(95.44)	15(4.56)		
组织学类型				2.025	0.155			29.507	<0.001
腺癌	698	685(98.14)	13(1.86)			668(95.70)	30(4.30)		
黏液腺癌	163	157(96.32)	6(3.68)			137(84.05)	26(15.95)		
肿瘤最大径(cm)				1.149	0.563			48.625	<0.001
≥5	151	146(96.69)	5(3.31)			122(80.79)	29(19.21)		
3~<5	536	526(98.13)	10(1.87)			515(96.08)	21(3.92)		
<3	174	170(97.70)	4(2.30)			168(96.55)	6(3.45)		
分化程度				2.014	0.365			10.151	0.006
高	95	91(95.79)	4(4.21)			90(94.74)	5(5.26)		
中	675	662(98.07)	13(1.93)			637(94.37)	38(5.63)		
低	91	89(97.80)	2(2.20)			78(85.71)	13(14.29)		
TNM 分期				0.063	0.801			10.801	0.001
I + II 期	474	463(97.68)	11(2.32)			455(95.99)	19(4.01)		
Ⅲ+Ⅳ期	387	379(97.93)	8(2.07)			350(90.44)	37(9.56)		
浸润深度				0.025	0.874			0.698	0.403
T1+T2	125	122(97.60)	3(2.40)			119(95.20)	6(4.80)		
T3+T4	736	720(97.83)	16(2.17)			686(93.21)	50(6.79)		
淋巴结转移				0.634	0.426			8.633	0.003

续表 2 MMR 蛋白表达、KRAS、NRAS 和 BRAF 基因突变与 CRC 患者临床病理特征的关系[*n*(%)]

项目	<i>n</i>	MMR				KRAS			
		MSI-H	MSS	χ^2	<i>P</i>	野生型	突变型	χ^2	<i>P</i>
无	485	476(98.14)	9(1.86)	7.539	0.006	464(95.67)	21(4.33)	0.702	0.402
有	376	366(97.34)	10(2.66)			341(90.69)	35(9.31)		
CEA 水平									
阳性	369	355(96.21)	14(3.79)	0.326	0.568	348(94.31)	21(5.69)	0.620	0.431
阴性	492	487(98.98)	5(1.02)			457(92.89)	35(7.11)		
CA199 水平									
阳性	223	217(97.31)	6(2.69)	0.326	0.568	206(92.38)	17(7.62)	0.620	0.431
阴性	638	625(97.96)	13(2.04)			599(93.89)	39(6.11)		

表 3 CRC 患者 2 年内死亡影响因素的 COX 回归模型

因素	单因素分析		多因素分析		
	Log-rank	<i>P</i>	<i>HR</i>	95% <i>CI</i>	<i>P</i>
性别	0.742	0.389			
年龄	1.958	0.162			
肿瘤部位	0.050	0.823			
组织学类型	1.678	0.195			
肿瘤最大径	0.177	0.674			
分化程度	0.326	0.568			
TNM 分期	1.542	0.214			
浸润深度	0.315	0.574			
淋巴结转移状态	5.453	0.020	32.413	1.749~600.775	0.003
CEA	2.240	0.135			
CA199	3.823	0.063			
MSI-H	6.107	0.013	0.069	0.008~0.574	0.002
KRAS	6.440	0.011	54.158	2.481~1 182.069	0.002
NRAS	1.526	0.217			
BRAF	6.932	0.008	17.342	2.073~145.037	0.002

3 讨 论

《中国结直肠癌诊疗规范(2020 年版)》^[13] 推荐检测的 CRC 分子生物标志物包括 MSI、Ras、BRAF 等,其中 MSI 作为Ⅰ级推荐,Ras(包括 K-Ras 和 N-Ras)、BRAF 作为Ⅱ级推荐,并建议根据检测结果制订相应的治疗方案。DU 等^[14] 和 HE 等^[15] 研究显示,MSH2、MSH6、MLH1 和 PMS2 为临床上首选检测 MMR 蛋白的关键生物标志物。

本研究中,CRC 患者的 MMR 蛋白表达缺失率为 12.08%,与高菲等^[16] 的研究中 MMR 蛋白表达缺失率为 11.3% 较接近;MMR 蛋白表达缺失以 MLH1 缺失+PMS2 缺失为主,与黎相照等^[17] 研究结论基本吻合。本研究结果显示,KRAS 的基因突变率为 42.28%,略高于孙屏等^[18] 研究的 40.59%,可能所研究的标本分期有关;NRAS 基因突变率为 2.21%,与孙耀华等^[19] 研究中 NRAS 的基因突变率为 2.74% 接

近,误差可能是由样本量不同导致的;BRAF 基因突变率为 6.50%,略低于 TABERNERO 等^[20] 报道的欧洲和美国人 10% 的 BRAF 基因突变率,可能是因为人种的差异,也有可能是因为本研究纳入的研究对象是Ⅰ~Ⅳ期 CRC 患者,而 TABERNERO 等^[20] 的研究对象是转移性结直肠癌(mCRC)患者。

本研究结果发现,MMR 蛋白表达与 KRAS 基因突变呈负相关,MMR 蛋白表达与 NRAS 基因突变不相关。MMR 蛋白表达与 BRAF 基因突变呈正相关,与 KIM 等^[21] 和 DARIYA 等^[22] 的研究结论一致。本研究的 MSI 患者大多为 KRAS 野生型,患者预后相对较好,而 KRAS 突变患者预后较差,这一现象与 MMR 蛋白表达与 KRAS 基因突变呈负相关的研究结论相对应。本研究结果还显示,淋巴结转移、KRAS 突变、BRAF 突变是 CRC 患者 2 年内死亡的危险因素,而 MSI-H 是 CRC 患者 2 年内死亡的保护因素。

这一研究结论与 SAHIN 等^[23]的研究结果相一致。江少锋等^[24]研究发现伴肝转移的 CRC 原发灶内 MSI-H 率降低,与本文研究结论相符。

KRAS 突变、BRAF 突变预示 CRC 预后差的原因可能是:KRAS 突变、BRAF 突变的通路上的都具有刺激细胞增殖的作用,且对部分化疗药物存在抗药性。有淋巴结转移的 CRC 患者,即使原发切除了转移灶肿瘤依然继续生长,因此淋巴结转移越多,患者预后越差。本课题组认为,MSI 的 CRC 患者预后较好的原因有 2 个,其一是修复机制的问题导致突变负荷增加,更容易发生突变,有利于免疫系统识别杀伤,往往伴有较多的淋巴细胞等免疫细胞浸润,发展比较慢,也对免疫治疗更敏感;其二是 MSI 机制引起肿瘤微环境改变,导致免疫细胞浸润,抑制肿瘤发展。

因为受限于研究时间,本研究的样本量偏小,本课题组后续将进一步加大符合纳入标准样本的收集,加强临床和实验室的紧密合作,促进基础向临床的转化。

参考文献

- [1] BAIDOUN F,ELSHIWY K,ELKERAIE Y,et al. Colorectal cancer epidemiology: recent trends and impact on outcomes[J]. *Curr Drug Targets*,2021,22(9):998-1009.
- [2] CAO W,CHEN H D,YU Y W,et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China:a secondary analysis of the global cancer statistics 2020[J]. *Chin Med J (Engl)*,2021,134(7):783-791.
- [3] GAO R,WU C,ZHU Y,et al. Integrated analysis of colorectal cancer reveals cross-cohort gut microbial signatures and associated serum metabolites[J]. *Gastroenterology*,2022,163(4):1024-1037.
- [4] 米迷,翁姗姗,陆德珉,等. 2021 年晚期结直肠癌治疗研究进展[J]. *实用肿瘤杂志*,2022,37(1):23-28.
- [5] HAMPEL H,KALADY M F,PEARLMAN R,et al. Hereditary colorectal cancer[J]. *Hematol Oncol Clin North Am*,2022,36(3):429-447.
- [6] CHEN K,COLLINS G,WANG H,et al. Pathological features and prognostication in colorectal cancer[J]. *Curr Oncol*,2021,28(6):5356-5383.
- [7] AMIN M B,GREENE F L,EDGE S B,et al. The eighth edition AJCC cancer staging manual:continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging[J]. *CA Cancer J Clin*,2017,67(2):93-99.
- [8] 中华医学会. 临床技术操作规范病理学分册[M]. 北京:人民军医出版社,2012:33.
- [9] LIZARDO D Y,KUANG C,HAO S,et al. Immunotherapy efficacy on mismatch repair-deficient colorectal cancer: From bench to bedside[J]. *Biochim Biophys Acta Rev*

- Cancer*,2020,1874(2):188447.
- [10] FLECCHIA C,ZAANAN A,LAHLOU W,et al. MSI colorectal cancer,all you need to know[J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*,2022,46(9):101983.
- [11] EFFENDI-YS R. Colonoscopy,biomarkers, and targeted therapy in colorectal cancer[J]. *Acta Med Indones*,2022,54(3):476-486.
- [12] LAKEMEYER L,SANDER S,WITTAU M,et al. Diagnostic and prognostic value of CEA and CA19-9 in colorectal cancer[J]. *Diseases*,2021,9(1):21.
- [13] 国家卫生健康委员会. 中国结直肠癌诊疗规范(2020 年版)[J]. *中华外科杂志*,2020,58(8):561-585.
- [14] DU F,LIU Y. Predictive molecular markers for the treatment with immune checkpoint inhibitors in colorectal cancer[J]. *J Clin Lab Anal*,2022,36(1):e24141.
- [15] HE Y,ZHANG L,ZHOU R,et al. The role of DNA mismatch repair in immunotherapy of human cancer[J]. *Int J Biol Sci*,2022,18(7):2821-2832.
- [16] 高菲,郭业兵,王木森,等. 结直肠癌组织中错配修复蛋白基因表达与临床病理及 KRAS BRAF 基因突变的相关性分析[J]. *实用医技杂志*,2022,29(5):475-479.
- [17] 黎相照,刘焕娇,梁敏仪,等. 微卫星不稳定性类型及临床病理特征:基于 1 394 例结直肠癌患者的标本检[J]. *南方医科大学学报*,2020,40(11):1645-1650.
- [18] 孙屏,郭兴美,吕慧,等. 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.
- [19] 孙耀华,汪润秋,赵静,等. 结直肠癌组织中 KRAS,NRAS 及 BRAF 基因突变状态与临床病理特征的关系[J]. *郑州大学学报(医学版)*,2021,56(1):53-57.
- [20] TABERNERO J,VELEZ L,TREVINO T L,et al. Management of adverse events from the treatment of encorafenib plus cetuximab for patients with BRAF V600E-mutant metastatic colorectal cancer: insights from the BEACON CRC study[J]. *ESMO Open*,2021,6(6):100328.
- [21] KIM J C,BODMER W F. Genomic landscape of colorectal carcinogenesis[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*,2022,148(3):533-545.
- [22] DARIYA B,ALIYA S,MERCHANT N,et al. Colorectal cancer biology,diagnosis,and therapeutic approaches[J]. *Crit Rev Oncog*,2020,25(2):71-94.
- [23] SAHIN I H,AKCE M,ALESE O,et al. Immune checkpoint inhibitors for the treatment of MSI-H/MMR-D colorectal cancer and a perspective on resistance mechanisms[J]. *Br J Cancer*,2019,121(10):809-818.
- [24] 江少锋,杨晓琳,贺滢,等. 伴肝转移性结直肠癌患者微卫星不稳定率与 PD-L1/PD-1 表达及预后的相关性研究[J]. *国际检验医学杂志*,2023,44(9):1039-1043.