

· 论著 ·

结直肠癌 KRAS、NRAS 和 BRAF 基因 罕见突变类型及其临床意义 (附 1 513 例)

李艳艳 高静 吉聪聪 章程 李一林 李健 沈琳

北京大学肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所消化肿瘤内科 恶性肿瘤发病机制及转化研究
教育部重点实验室 100142

通信作者:沈琳,Email:shenlin@bjmu.edu.cn

【摘要】 目的 探讨结直肠癌 KRAS、NRAS 和 BRAF 基因罕见突变类型及其临床意义。**方法** 采用回顾性描述性研究方法。收集 2013 年 12 月至 2018 年 11 月北京大学肿瘤医院收治的 1 513 例结直肠癌患者的临床病理资料;男 921 例,女 592 例;平均年龄为 59 岁,年龄范围为 15~97 岁。提取肿瘤组织基因组 DNA,采用 Sanger 测序法进行 KRAS(第 2、3 外显子),NRAS(第 2、3 外显子)和 BRAF(第 15 外显子)基因突变检测。观察指标:(1)KRAS、NRAS 和 BRAF 基因突变类型情况。(2)KRAS、NRAS 和 BRAF 基因突变类型与临床病理特征的关系。(3)单一基因罕见突变及其临床病理特征。(4)同时 2 种基因突变及其临床病理特征。计数资料采用绝对数和百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验。**结果** (1)KRAS、NRAS 和 BRAF 基因突变类型情况:1 513 例结直肠癌患者中,KRAS、NRAS 和 BRAF 的基因突变率分别为 37.806%(572/1 513)、3.173%(48/1 513)和 5.486%(83/1 513)。KRAS 外显子 2 突变率为 35.889%(543/1 513),外显子 3 突变率为 1.917%(29/1 513)。NRAS 外显子 2 突变率为 1.322%(20/1 513),外显子 3 突变率为 1.851%(28/1 513)。BRAF 外显子 15 突变率为 5.486%(83/1 513)。KRAS 基因突变类型主要为外显子 2 第 12、13 密码子和外显子 3 第 61 密码子突变,突变率分别为 27.759%(420/1 513)、7.733%(117/1 513)和 1.586%(24/1 513)。7 例结直肠癌患者发生 KRAS 基因第 14、59 及 60 密码子区域的罕见突变,突变率为 0.463%(7/1 513),其中 2 例[0.132%(2/1 513)]V14I 突变、2 例[0.132%(2/1 513)]A59T 突变、2 例[0.132%(2/1 513)]A59E 及 1 例[0.066%(1/1 513)]G60D 突变。NRAS 基因突变类型主要为外显子 2 第 12、13 密码子及外显子 3 第 61 密码子突变,突变类型主要为 Q61K,突变率为 0.925%(14/1 513),其次为 G12D 突变,突变率为 0.727%(11/1 513)。Q61R、Q61H、Q61L、G13R、G12C、G12V、G12S、G13D 及 G13C 的突变率均较低。BRAF 基因突变类型主要为外显子 15 第 600 密码子突变,突变类型主要为 V600E 突变,突变率为 4.957%(75/1 513)。8 例结直肠癌患者发生 BRAF 基因罕见突变,突变率为 0.529%(8/1 513),其中 5 例[0.330%(5/1 513)]D594G 突变、1 例[0.066%(1/1 513)]D594H 突变、1 例[0.066%(1/1 513)]S607T 突变及 1 例[0.066%(1/1 513)]599~600 密码子插入突变 AGA(T599 V600insAGA)。1 513 例患者中,4 例[(0.264%,4/1 513)]发生 KRAS 基因第 12 及 13 密码子同时突变,其中 2 例[(0.132%,2/1 513)]发生 G12V 与 G13D 同时突变;1 例[(0.066%,1/1 513)]发生 G12D 与 G13A 同时突变;1 例[(0.066%,1/1 513)]发生 G12V 与 G13F 同时突变。此外,1 例[(0.066%,1/1 513)]发生 KRAS G13D 与 NRAS G12S 同时突变,1 例[(0.066%,1/1 513)]发生 KRAS G12C 与 NRAS Q61H 同时突变。(2)KRAS、NRAS 和 BRAF 基因突变类型与临床病理特征的关系:KRAS 基因突变中肿瘤部位、肿瘤分化程度比较,差异均有统计学意义($\chi^2=25.317, 4.166, P<0.05$)。BRAF 基因突变中性别、肿瘤部位、肿瘤分化程度、淋巴结转移比较,差异均有统计学意义($\chi^2=11.290, 22.317, 38.035, 12.611, P<0.05$)。进一步研究结果显示:NRAS 基因突变类型中 Q61K 突变和 Q61R 突变发生在年龄<65 岁、≥65 岁比例分别为 12/18、2/10 和 1/18、5/10,两者比较,差异均有统计学意义($\chi^2=5.600, 7.542, P<0.05$)。(3)单一基因罕见突变及其临床病理特征:1 513 例患者中,15 例发生单一基因罕见突变。7 例发生 KRAS 基因第 14、59 及 60 密码子罕见突变患者中,男 6 例,女 1 例;年龄<65 岁 6 例,年龄≥65 岁 1 例;肿瘤位于左半结肠 3 例,右半结肠 3 例,直肠 1 例;肿瘤组织学类型及分化程度为高、中分化腺癌 6 例,低分化腺癌 1 例;TNM 分期Ⅳ期 6 例,Ⅱ期 1 例;有远处转移 6 例,无远处转移 1 例;有淋巴结转移 3 例,无淋巴结转移 4 例;术后均无复发。8 例发生 BRAF 基因罕见突

变患者中,男 4 例,女 4 例;年龄<65 岁 4 例,年龄≥65 岁 4 例;肿瘤位于左半结肠 5 例,右半结肠 1 例,直肠 2 例;肿瘤组织学类型及分化程度为中分化腺癌 7 例,低分化腺癌 1 例;TNM 分期Ⅳ期 5 例,Ⅲ期 2 例,Ⅱ期 1 例;有远处转移 6 例,无远处转移 2 例;有淋巴结转移 3 例,无淋巴结转移 5 例;术后复发 1 例。(4)同时 2 种基因突变及其临床病理特征:1 513 例患者中,6 例发生同时 2 种基因突变,男 5 例,女 1 例;年龄<65 岁 2 例,年龄≥65 岁 4 例;肿瘤位于左半结肠 1 例,右半结肠 4 例,直肠 1 例;肿瘤组织学类型及分化程度为高、中分化腺癌 5 例,低分化腺癌 1 例;TNM 分期Ⅳ期 5 例,Ⅱ期 1 例;有远处转移 4 例,无远处转移 2 例;有淋巴结转移 3 例,无淋巴结转移 3 例;术后复发 1 例。**结论** 结直肠癌患者的 KRAS 和 BRAF 基因罕见突变常发生在罕见的密码子区域,并以点突变为主,KRAS、NRAS 和 BRAF 基因突变与临床病理特征相关,可为结直肠癌的治疗提供重要依据。

【关键词】 结直肠肿瘤; KRAS; NRAS; BRAF; 突变; 表皮生长因子受体

基金项目:国家重点研发计划(2017YFC1309004)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2020.03.018

Infrequent gene mutations of KRAS, NRAS and BRAF in colorectal cancer and their clinical significance: a report of 1 513 cases

Li Yanyan, Gao Jing, Ji Congcong, Zhang Cheng, Li Yilin, Li Jian, Shen Lin

Key Laboratory of Carcinogenesis and Translational Research (Ministry of Education/Beijing), Department of Gastrointestinal Oncology, Peking University Cancer Hospital & Institute, Beijing 100142, China

Corresponding author: Shen Lin, Email: shenlin@bjmu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To investigate the infrequent gene mutations of KRAS, NRAS and BRAF in colorectal cancer and their clinical significance. **Methods** The retrospective and descriptive study was conducted. The clinicopathological data of 1 513 patients with colorectal cancer who were admitted to the Peking University Cancer Hospital from December 2013 to November 2018 were collected. There were 921 males and 592 females, aged from 15 to 97 years, with an average age of 59 years. The genomic DNA of tumor tissue was extracted, and the mutation status of KRAS (exon 2, 3), NRAS (exon 2, 3) and BRAF (exon 15) was detected by the Sanger sequencing. Observation indicators: (1) mutation status of KRAS, NRAS and BRAF; (2) relationship of different mutation status of KRAS, NRAS and BRAF with clinicopathological characteristics; (3) infrequent mutation status of single gene and its clinicopathological characteristics; (4) simultaneous mutations of two genes and their clinicopathological characteristics. Count data were expressed by absolute numbers or percentages, and comparison between groups was analyzed by the chi-square test. **Results** (1) Mutation status of KRAS, NRAS and BRAF: the mutation rates of KRAS, NRAS and BRAF were 37.806% (572/1 513), 3.173% (48/1 513) and 5.486% (83/1 513) of the 1 513 patients with colorectal cancer, respectively. The mutation rates of exon 2 and exon 3 in KRAS were 35.889% (543/1 513) and 1.917% (29/1 513), respectively. The mutation rates of exon 2 and exon 3 in NRAS were 1.322% (20/1 513) and 1.851% (28/1 513), respectively. The mutation rate of exon 15 in BRAF was 5.486% (83/1 513). The mutation of KRAS mainly occurred in codon 12, 13 of exon 2 and codon 61 of exon 3, with a mutation rate of 27.759% (420/1 513), 7.733% (117/1 513), and 1.586% (24/1 513), respectively. Infrequent mutation in codon 14, 59, 60 of KRAS were found in 7 patients with colorectal cancer [0.463% (7/1 513)], including V14I mutation in 2 cases [0.132% (2/1 513)], A59T mutation in 2 cases [0.132% (2/1 513)], A59E mutation in 2 cases [0.132% (2/1 513)] and G60D mutation in 1 case [0.066% (1/1 513)]. The mutation of NRAS mainly occurred in codon 12, 13 of exon 2 and codon 61 of exon 3, including Q61K with a mutation rate of 0.925% (14/1 513), followed by G12D with a mutation rate of 0.727% (11/1 513). The mutation rates of Q61R, Q61H, Q61L, G13R, G12C, G12V, G12S, G13D, and G13C were relatively low. The mutation of BRAF mainly occurred in codon 600 of exon 15 as V600E mutation, with a mutation rate of 4.957% (75/1 513). Infrequent mutation in BRAF were found in 8 patients with colorectal cancer, with a mutation rate of 0.529% (8/1 513), including D594G mutation in 5 cases [0.330% (5/1 513)], D594H mutation in 1 case [0.066% (1/1 513)], S607T mutation in 1 case [0.066% (1/1 513)], and 599–600 codon insertion AGA in 1 case [0.066% (1/1 513)]. Of the 1 513 patients, 4 [0.264% (4/1 513)] had simultaneous mutations at codon 12 and 13 of KRAS, including 2 [0.132% (2/1 513)] with simultaneous mutations at G12V and G13D, 1 [0.066% (1/1 513)] with simultaneous mutations at G12D and G13A, and 1 [0.066% (1/1 513)] with simultaneous mutations at G12V and G13F. In addition, 1 patient [0.066% (1/1 513)] had simultaneous mutations at G13D of KRAS and G12S of NRAS, and 1 patient [0.066% (1/1 513)] had simultaneous mutations at G12C of KRAS and Q61H of NRAS. (2) Relationship of different mutation status of KRAS, NRAS and BRAF with clinicopathological characteristics: patients with different tumor location and tumor

differentiation degree had significantly different KRAS mutation status ($\chi^2 = 25.317, 4.166, P < 0.05$); patients with different gender, tumor location, tumor differentiation degree, and lymph node metastasis had significantly different BRAF mutation status ($\chi^2 = 11.290, 22.317, 38.035, 12.611, P < 0.05$). The proportion of Q61K mutation and Q61R mutation of NRAS in the patients with age of < 65 and ≥ 65 years was 12/18, 2/10 and 1/18, 5/10, respectively, showing significant differences between the two groups ($\chi^2 = 5.600, 7.542, P < 0.05$). (3) Infrequent mutation status of single gene and its clinicopathological characteristics: 15 of the 1 513 patients had single gene mutation. Of the 7 patients with infrequent mutations in codon 14, 59 and 60 of KRAS, 6 were males and 1 was female; 6 were < 65 years old and 1 was ≥ 65 years old; 3 had tumors located in the left colon, 3 in the right colon and 1 in the rectum; 6 had highly or moderately differentiated adenocarcinoma and 1 had poorly differentiated adenocarcinoma; 6 were in stage IV and 1 was in stage II of TNM staging; 6 had distant metastasis and 1 had no distant metastasis; 3 had lymph node metastasis and 4 had no lymph node metastasis; there was no postoperative recurrence. Of the 8 patients with infrequent gene mutation of BRAF, 4 were males and 4 were females; 4 were < 65 years old and 4 were ≥ 65 years old; 5 had tumors located in the left colon, 1 in the right colon and 2 in the rectum; 7 had moderately differentiated adenocarcinoma and 1 had poorly differentiated adenocarcinoma; 5 were in stage IV, 2 in stage III, and 1 in stage II of TNM staging; 6 had distant metastasis and 2 had no distant metastasis; 3 had lymph node metastasis and 5 had no lymph node metastasis; 1 had postoperative recurrence. (4) Simultaneous mutations of two genes and their clinicopathological characteristics: 6 of the 1 513 patients had simultaneous mutations of two genes. Of 6 patients with simultaneous mutations of two genes, 5 were males and 1 was female; 2 were < 65 years old and 4 were ≥ 65 years old; 1 had tumor located in the left colon, 4 in the right colon and 1 in the rectum; 5 had highly or moderately differentiated adenocarcinoma and 1 had poorly differentiated adenocarcinoma; 5 were in stage IV and 1 was in stage II of TNM staging; 4 had distant metastasis and 2 had no distant metastasis; 3 had lymph node metastasis and 3 had no lymph node metastasis; 1 had postoperative recurrence. **Conclusions** The infrequent mutations of KRAS and BRAF in colorectal cancer often occur in the rare codon region and mainly are point mutations. Different mutations of KRAS, NRAS and BRAF are related to clinicopathological features, which provide an important basis for treatment of colorectal cancer.

【Key words】 Colorectal neoplasms; KRAS; NRAS; BRAF; Mutation; Epidermal growth factor receptor

Fund program: National Key R&D Program of China (2017YFC1309004)

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2020.03.018

结直肠癌是全世界常见恶性肿瘤之一,最新研究结果显示:结直肠癌发病率及病死率分别位居世界恶性肿瘤的第4位及第2位^[1]。针对表皮生长因子受体(epithelial growth factor receptor, EGFR)的抗体治疗是目前晚期结直肠癌主要靶向治疗策略^[2-3]。EGFR单克隆抗体仅对KRAS、NRAS和BRAF基因野生型结直肠癌患者有效,因此,治疗前需常规行KRAS、NRAS和BRAF基因突变检测,筛选野生型基因结直肠癌患者^[4-7]。目前的研究结果显示:KRAS基因G12D、G12V、G13D, NRAS基因G12D和BRAF基因V600E突变是其主要突变类型,且与抗EGFR单克隆抗体的耐药性密切相关^[8-10]。因此,临床中发现具有以上突变类型基因的患者不能从抗EGFR单克隆抗体治疗中获益。有文献报道:RAS和RAF基因还可发生其他罕见突变,且这些突变的结直肠癌患者临床病理特性及抗EGFR单克隆抗体的敏感性可能与常见突变不同^[11]。本研究回顾性分析2013年12月至2018年

11月我院收治的1 513例结直肠癌患者的临床病理资料,探讨结直肠癌KRAS、NRAS和BRAF基因罕见突变类型及其临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料

采用回顾性描述性研究方法。收集1 513例结直肠癌患者的临床病理资料;男921例,女592例;平均年龄为59岁,年龄范围为15~97岁。1 513例患者中, < 65 岁1 081例, ≥ 65 岁432例;结肠癌915例(右半结肠癌366例、左半结肠癌549例),直肠癌598例;腺癌1 390例,黏液腺癌123例;肿瘤分化程度为高、中分化1 166例,低分化347例;TNM分期为I期23例,II期112例,III期251例,IV期1 127例;有远处转移1 127例,无远处转移386例;有淋巴结转移449例,无淋巴结转移1 064例;有术后复发转移275例,无术后复发转移1 238例。本研究符合《赫尔辛基宣言》的要求。患者及家属均签署知情

同意书。

1.2 纳入标准和排除标准

纳入标准:(1)临床确诊为结直肠癌。(2)行 KRAS、NRAS 和 BRAF 基因突变检测。(3)临床病理资料完整。

排除标准:(1)未行 KRAS、NRAS 和 BRAF 基因突变检测。(2)临床病理资料缺失。

1.3 KRAS、NRAS 和 BRAF 基因突变检测

使用石蜡包埋组织切片 DNA 提取试剂盒(德国 QIAGEN 公司, Cat No.56404)提取肿瘤组织基因组 DNA,通过 PCR 扩增 RAS 和(或)RAF 基因片段,PCR 扩增使用引物序列、扩增体系及流程参照文献[9]。PCR 产物经 3% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后,采用 Sanger 测序法(由北京天一辉远生物科技有限责任公司进行, ABIPRISM 3730 测序仪)进行 KRAS(第 2、3 外显子), NRAS(第 2、3 外显子)和 BRAF(第 15 外显子)突变检测。测序结果采用 Chromas 软件读取,并与美国国家生物技术信息中心基因库序列进行对比分析。

1.4 观察指标

观察指标:(1)KRAS、NRAS 和 BRAF 基因突变类型情况包括 KRAS、NRAS 和 BRAF 的基因突变率, KRAS、NRAS 和 BRAF 基因罕见突变类型。(2)KRAS、NRAS 和 BRAF 基因突变类型与临床病理特征的关系: KRAS、NRAS 和 BRAF 基因突变类型与性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤组织学类型、肿瘤分化程度、TNM 分期、远处转移、淋巴结转移、术后复发转移关系。(3)单一基因罕见突变及其临床病理特征:突变基因及类型,性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤组织学类型、肿瘤分化程度、TNM 分期、远处转移、淋巴结转移、术后复发转移。(4)同时 2 种基因突变及其临床病理特征:突变基因及类型,性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤组织学类型、肿瘤分化程度、TNM 分期、远处转移、淋巴结转移、术后复发转移。

1.5 统计学分析

应用 SPSS 21.0 统计软件进行分析。计数资料以绝对数和百分比表示,组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 KRAS、NRAS 和 BRAF 基因突变类型情况

1 513 例结直肠癌患者中, KRAS、NRAS 和 BRAF 的基因突变率分别为 37.806% (572/1 513)、3.173%

(48/1 513) 和 5.486% (83/1 513)。3 种基因各外显子突变分布情况见表 1。

表 1 1 513 例结直肠癌患者 KRAS、NRAS 和 BRAF 基因各外显子突变分布情况

基因	外显子	突变例数	比例(%)
KRAS	2	543	35.889
	3	29	1.917
NRAS	2	20	1.322
	3	28	1.851
BRAF	15	83	5.486

KRAS 基因突变类型主要为外显子 2 第 12、13 密码子和外显子 3 第 61 密码子突变,突变率分别为 27.759% (420/1 513)、7.733% (117/1 513) 和 1.586% (24/1 513)。7 例结直肠癌患者发生 KRAS 基因第 14、59 及 60 密码子区域的罕见突变,突变率为 0.463% (7/1 513),其中 2 例[0.132% (2/1 513)] V14I 突变、2 例[0.132% (2/1 513)] A59T 突变、2 例[0.132% (2/1 513)] A59E 及 1 例[0.066% (1/1 513)] G60D 突变。见图 1。

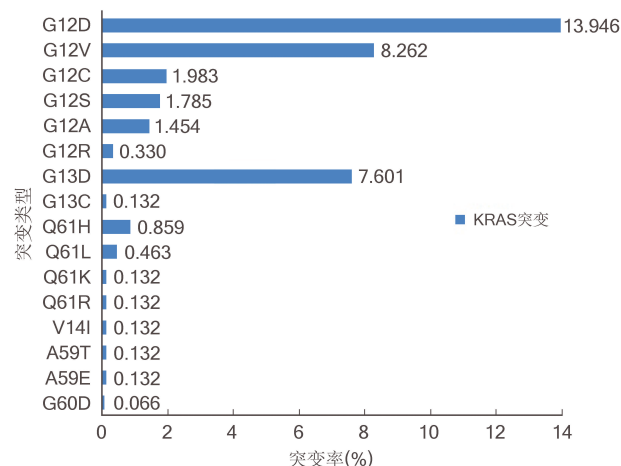


图 1 1 513 例结直肠癌患者 KRAS 基因突变类型及其突变率

NRAS 基因突变类型主要为外显子 2 第 12、13 密码子及外显子 3 第 61 密码子突变,突变类型主要为 Q61K 突变,突变率为 0.925% (14/1 513),其次为 G12D 突变,突变率为 0.727% (11/1 513)。Q61R、Q61H、Q61L、G13R、G12C、G12V、G12S、G13D 及 G13C 的突变率均较低。见图 2。

BRAF 基因突变类型主要为外显子 15 第 600 密码子突变,突变类型主要为 V600E 突变,突变率为 4.957% (75/1 513)。8 例结直肠癌患者发生

BRAF 基因罕见突变,突变率为 0.529% (8/1 513),其中 5 例 [0.330% (5/1 513)] D594G 突变、1 例 [0.066% (1/1 513)] D594H 突变、1 例 [0.066% (1/1 513)] S607T 突变及 1 例 [0.066% (1/1 513)] 599~600 密码子插入突变 AGA(T599 V600ins AGA)。见图 3。

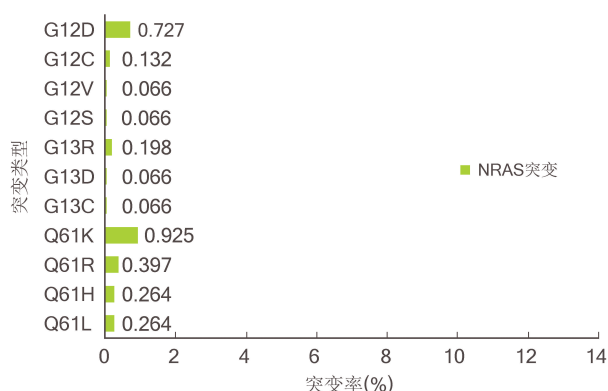


图2 1 513 例结直肠癌患者 NRAS 基因突变类型及其突变率

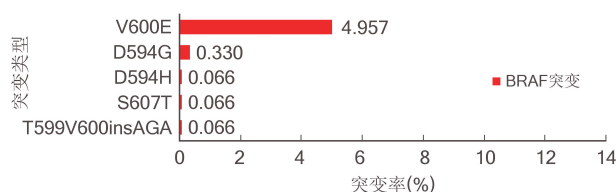


图3 1 513 例结直肠癌患者 BRAF 基因突变类型及其突变率

1 513 例患者中,4 例 [0.264% (4/1 513)] 发生 KRAS 基因第 12 及 13 密码子同时突变,其中 2 例 [0.132% (2/1 513)] 发生 G12V 与 G13D 同时突变;1 例 [0.066% (1/1 513)] 发生 G12D 与 G13A 同时突变;1 例 [0.066% (1/1 513)] 发生 G12V 与 G13F 同时突变。此外,1 例 [0.066% (1/1 513)] 发生 KRAS G13D 与 NRAS G12S 同时突变,1 例 [0.066% (1/1 513)] 发生 KRAS G12C 与 NRAS Q61H 同时突变。

2.2 KRAS、NRAS 和 BRAF 基因突变类型与临床病理特征的关系

KRAS 基因突变中肿瘤部位、肿瘤分化程度比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);而性别、年龄、肿瘤组织学类型、TNM 分期、远处转移、淋巴结转移、术后复发转移比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。NRAS 基因突变中性别、年龄、肿瘤部位、肿瘤组织学类型、肿瘤分化程度、TNM 分期、远处转移、淋巴结转移、术后复发转移比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。BRAF 基因突变中性别、肿瘤部位、肿瘤分化程度、淋巴结转移比较,差异均有统计

学意义 ($P < 0.05$)。而年龄、肿瘤组织学类型、TNM 分期、远处转移、术后复发转移比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

进一步研究结果显示:NRAS 基因突变类型中 Q61K 突变和 Q61R 突变发生在年龄 < 65 岁、 ≥ 65 岁比例分别为 12/18、2/10 和 1/18、5/10,两者比较,差异均有统计学意义 ($\chi^2 = 5.600, 7.542, P < 0.05$);而 Q61L 突变和 Q61H 突变发生在年龄 < 65 岁、 ≥ 65 岁比例分别为 4/18、0 和 1/18、3/10,两者比较,差异均无统计学意义 ($\chi^2 = 2.593, 3.137, P > 0.05$)。

2.3 单一基因罕见突变及其临床病理特征

1 513 例患者中,15 例发生单一基因罕见突变。7 例发生 KRAS 基因第 14、59 及 60 密码子罕见突变患者中,男 6 例,女 1 例;年龄 < 65 岁 6 例,年龄 ≥ 65 岁 1 例;肿瘤位于左半结肠 3 例,右半结肠 3 例,直肠 1 例;肿瘤组织学类型及分化程度为高、中分化腺癌 6 例,低分化腺癌 1 例;TNM 分期 IV 期 6 例,II 期 1 例;有远处转移 6 例,无远处转移 1 例;有淋巴结转移 3 例,无淋巴结转移 4 例;术后均无复发。8 例发生 BRAF 基因罕见突变患者中,男 4 例,女 4 例;年龄 < 65 岁 4 例,年龄 ≥ 65 岁 4 例;肿瘤位于左半结肠 5 例,右半结肠 1 例,直肠 2 例;肿瘤组织学类型及分化程度为中分化腺癌 7 例,低分化腺癌 1 例;TNM 分期 IV 期 5 例,III 期 2 例,II 期 1 例;有远处转移 6 例,无远处转移 2 例;有淋巴结转移 3 例,无淋巴结转移 5 例;术后复发 1 例。见表 3。

2.4 同时 2 种基因突变及其临床病理特征

1 513 例患者中,6 例发生同时 2 种基因突变,男 5 例,女 1 例;年龄 < 65 岁 2 例,年龄 ≥ 65 岁 4 例;肿瘤位于左半结肠 1 例,右半结肠 4 例,直肠 1 例;肿瘤组织学类型及分化程度为高、中分化腺癌 5 例,低分化腺癌 1 例;TNM 分期 IV 期 5 例,II 期 1 例;有远处转移 4 例,无远处转移 2 例;有淋巴结转移 3 例,无淋巴结转移 3 例;术后复发 1 例。见表 4。

3 讨论

目前,针对 KRAS、NRAS 和 BRAF 3 种基因罕见突变类型(如 KRAS A59T、A59E、G60D 突变,BRAF 非 V600E 突变)及其与临床病理特征关系的报道很少^[12-14]。如本研究中发现的 KRAS V14I 突变,前期仅在黏液性卵巢癌、髓系白血病及努南综合征中报道^[15-17]。而在中国结直肠癌患者中,仅有 1 篇研究报道了该位点突变,但未对其临床病理特征进行分析^[18]。此外,由于 NRAS 基因本身突变罕见^[19-21]。

表 2 1 513 例结直肠癌患者 KRAS、NRAS 和 BRAF 基因突变与临床病理特征的关系

临床病理因素	例数	KRAS 基因突变 (572 例)	χ^2 值	P 值	NRAS 基因突变 (48 例)	χ^2 值	P 值	BRAF 基因突变 (83 例)	χ^2 值	P 值
性别										
男	921	333	2.723	>0.05	26	0.936	>0.05	36	11.290	<0.05
女	592	239			22			47		
年龄(岁)										
≥65	432	179	3.388	>0.05	16	0.555	>0.05	26	0.331	>0.05
<65	1 081	393			32			57		
肿瘤部位										
右半结肠	366	179	25.317	<0.05	11	0.879	>0.05	37	22.317	<0.05
左半结肠	549	189			15			28		
直肠	598	204			22			18		
肿瘤组织学类型										
腺癌	1 390	528	0.235	>0.05	47	2.426	>0.05	74	0.866	>0.05
黏液腺癌	123	44			1			9		
肿瘤分化程度										
高、中分化	1 166	457	4.166	<0.05	41	1.956	>0.05	41	38.035	<0.05
低分化	347	115			7			42		
TNM 分期										
I 期	23	5	3.732	>0.05	0	1.397	>0.05	0	2.470	>0.05
II 期	112	47			3			4		
III 期	251	99			10			13		
IV 期	1 127	421			35			66		
远处转移										
有	1 127	421	0.380	>0.05	35	0.064	>0.05	66	1.169	>0.05
无	386	151			13			17		
淋巴结转移										
有	449	167	0.102	>0.05	13	0.160	>0.05	39	12.611	<0.05
无	1 064	405			35			44		
术后复发转移										
有	275	117	3.211	>0.05	6	1.074	>0.05	13	0.3736	>0.05
无	1 238	455			42			70		

表 3 15 例发生单一基因罕见突变结直肠癌患者的临床病理特征

患者编号	突变基因及类型	性别	年龄(岁)	肿瘤部位	肿瘤组织学 类型	肿瘤分化 程度	TNM 分期	远处转移	淋巴结转移	术后复发转移
1	KRAS V14I	男	55	右半结肠	腺癌	高分化	IV 期	有	有	无
2	KRAS V14I	女	63	右半结肠	腺癌	中分化	II 期	无	无	无
3	KRAS A59T	男	48	右半结肠	腺癌	低分化	IV 期	有	无	无
4	KRAS A59T	男	66	左半结肠	腺癌	中分化	IV 期	有	有	无
5	KRAS A59E	男	49	左半结肠	腺癌	中分化	IV 期	有	无	无
6	KRAS A59E	男	63	直肠	腺癌	中分化	IV 期	有	无	无
7	KRAS G60D	男	42	左半结肠	腺癌	中分化	IV 期	有	有	无
8	BRAF D594G	女	66	左半结肠	腺癌	中分化	III 期	无	无	无
9	BRAF D594G	女	80	左半结肠	腺癌	低分化	III 期	无	无	无
10	BRAF D594G	女	62	右半结肠	腺癌	中分化	IV 期	有	无	无
11	BRAF D594G	男	69	左半结肠	腺癌	中分化	IV 期	有	无	无
12	BRAF D594G	男	57	直肠	腺癌	中分化	IV 期	有	有	无
13	BRAF D594H	男	76	左半结肠	腺癌	中分化	IV 期	有	有	无
14	BRAF S607T	男	60	直肠	腺癌	中分化	II 期	有	无	有
15	BRAF T599 V600insAGA	女	63	左半结肠	腺癌	中分化	IV 期	有	有	无

表 4 6 例发生同时两种基因突变结直肠癌患者的临床病理特征

患者编号	同时突变位点及类型	性别	年龄 (岁)	肿瘤部位	肿瘤组织学 类型	肿瘤分化 程度	TNM 分期	远处转移	淋巴结转移	术后复发 转移
1	KRAS G12V/G13D	男	67	右半结肠	腺癌	中分化	Ⅳ期	有	无	无
2	KRAS G12V/G13D	男	67	直肠	腺癌	低分化	Ⅳ期	无	有	无
3	KRAS G12D/G13A	男	39	左半结肠	腺癌	中分化	Ⅳ期	有	无	无
4	KRAS G12V/G13F	女	68	右半结肠	腺癌	中分化	Ⅱ期	无	无	无
5	KRAS G13D/NRAS G12S	男	47	右半结肠	腺癌	中分化	Ⅳ期	有	有	有
6	KRAS G12C/NRAS Q61H	男	74	右半结肠	腺癌	高分化	Ⅳ期	有	有	无

NRAS 不同突变类型与结直肠癌患者的临床病理特征关系尚不明确。因此,本研究基于 1 513 例结直肠癌患者的临床病理资料,进一步分析了 KRAS、NRAS 和 BRAF 基因不同突变类型在中国结直肠癌患者中的分布,并发现 3 种基因存在多种不同的罕见突变类型。

本研究中 KRAS、NRAS 和 BRAF 基因突变率与西方国家的报道相符^[22-25]。KRAS 基因除常见的第 12、13 及 61 密码子突变类型外,还存在第 14 密码子 V14I、第 59 密码子 A59T 和 A59E 及第 60 密码子 G60D 的罕见突变类型。而 BRAF 基因除通常报道的 V600E 突变外,其还存在第 594 密码子的 D594G 及 D594H 突变类型、第 607 密码子的 S607T 突变及第 599~600 密码子之间插入突变 T599 V600insAGA^[26-27]。尽管有研究结果显示:KRAS、NRAS 和 BRAF 基因之间均存在排他性^[28-29]。但本研究还发现存在 KRAS 基因第 12 及 13 密码子区域的同时突变以及 KRAS 和 NRAS 基因的同时突变。

在 3 种基因不同突变类型与临床病理特征关系研究中发现:KRAS 和 BRAF 基因突变在右半结肠癌中比例明显更高,与国外研究结果一致^[30-31]。KRAS 基因突变通常发生在高、中分化结直肠癌中,而 BRAF 基因突变则更常发生在低分化结直肠癌中,提示 BRAF 基因突变与预后较差相关,可以作为预后不良的主要预测因素^[32]。NRAS 基因突变与结直肠癌患者临床病理特征无明显相关性,但进一步对 NRAS 基因不同突变类型的研究结果显示:NRAS 中 Q61K 突变在年龄<65 岁的结直肠癌患者中比例明显升高,而 Q61R 突变在年龄≥65 岁的结直肠癌患者中比例明显升高。

本研究进一步发现 KRAS 基因第 14、59 及 60 密码子突变的发生可能与肿瘤分化程度较好及远处转移的发生相关;BRAF 基因第 594 密码子的突变更多发生在左半结肠癌患者中。

大量研究结果证实 KRAS、NRAS 和 BRAF 基因突变与抗 EGFR 治疗耐药性密切相关^[33-36]。但相关研究主要针对 3 种基因的常见基因突变类型,而其罕见基因突变类型是否与常见突变的生物学功能相同,是否在抗 EGFR 单克隆抗体治疗的敏感性上存在差异则研究较少。Lou 等^[11]报道 1 例存在 KRAS A59T 突变的结直肠癌患者。该患者为左半结肠中分化腺癌,同时伴有肝、肺、骨等部位的远处转移,在一、二线基础化疗方案联合贝伐珠单抗治疗进展后,对该例患者进行抗 EGFR 抑制剂帕尼单抗治疗,发现该患者对帕尼单抗治疗敏感。由此推论:3 种基因的罕见突变可能具有不同的生物学功能,且很可能对抗 EGFR 单克隆抗体的治疗并非完全耐药。因此,在未来的研究和临床中,值得进一步关注这些罕见的基因突变类型,以及其对抗 EGFR 单克隆抗体治疗的有效性。

综上,本研究结果发现:KRAS、NRAS 和 BRAF 3 种基因的罕见突变率通常<1%,但其发生与结直肠癌患者的临床病理特征具有密切关系,且可能相对于常见基因突变类型,对抗 EGFR 单克隆抗体的治疗存在完全不同的治疗疗效及响应。由于目前临床中针对 KRAS、NRAS 及 BRAF 3 种基因突变,均不使用抗 EGFR 单克隆抗体的治疗,因此,本研究无法收集罕见基因突变患者对抗 EGFR 治疗的疗效信息。未来的研究及临床中,在关注 3 种基因罕见突变的基础上,笔者团队会尝试进行抗 EGFR 治疗,并系统研究罕见基因突变类型与抗 EGFR 治疗疗效的相关性,为结直肠癌的靶向治疗提供更精准的信息。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68 (6): 394-424. DOI: 10.3322/caac.21492.
- Douillard JY, Oliner KS, Siena S, et al. Panitumumab-FOLFOX4

- treatment and RAS mutations in colorectal cancer[J]. *N Engl J Med*, 2013, 369(11): 1023-1034. DOI: 10.1056/NEJMoa1305275.
- [3] Spano JP, Fagard R, Soria JC, et al. Epidermal growth factor receptor signaling in colorectal cancer: preclinical data and therapeutic perspectives[J]. *Ann Oncol*, 2005, 16(2): 189-194. DOI: 10.1093/annonc/mdi057.
 - [4] Dienstmann R, Salazar R, Tabernero J. Personalizing colon cancer adjuvant therapy: selecting optimal treatments for individual patients[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(16): 1787-1796. DOI: 10.1200/JCO.2014.60.0213.
 - [5] Cremolini C, Antoniotti C, Lonardi S, et al. Activity and safety of cetuximab plus modified FOLFOXIRI followed by maintenance with cetuximab or bevacizumab for RAS and BRAF wild-type metastatic colorectal cancer: a randomized phase 2 clinical trial[J]. *JAMA Oncol*, 2018, 4(4): 529-536. DOI: 10.1001/jamaoncol.2017.5314.
 - [6] 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. DOI: 10.1111/ajco.12342.
 - [7] Negru S, Papadopoulou E, Apressos A, et al. KRAS, NRAS and BRAF mutations in Greek and Romanian patients with colorectal cancer: a cohort study[J]. *BMJ Open*, 2014, 4(5): e004652. DOI: 10.1136/bmjopen-2013-004652.
 - [8] Saeed O, Lopez-Beltran A, Fisher KW, et al. RAS genes in colorectal carcinoma: pathogenesis, testing guidelines and treatment implications[J]. *J Clin Pathol*, 2019, 72(2): 135-139. DOI: 10.1136/jclinpath-2018-205471.
 - [9] Dienstmann R, Salazar R, Tabernero J. Molecular subtypes and the evolution of treatment decisions in metastatic colorectal cancer[J]. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 2018, 38: 231-238. DOI: 10.1200/EDBK_200929.
 - [10] Gao J, Wang TT, Yu JW, et al. Wild-type KRAS and BRAF could predict response to cetuximab in Chinese colorectal cancer patients[J]. *Chin J Cancer Res*, 2011, 23(4): 271-275. DOI: 10.1007/s11670-011-0271-4.
 - [11] Lou E, D'Souza D, Nelson AC. Therapeutic response of metastatic colorectal cancer harboring a KRAS missense mutation after combination chemotherapy with the EGFR inhibitor panitumumab[J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2017, 15(4): 427-432. DOI: 10.6004/jncn.2017.0043.
 - [12] De Luca C, Vigliar E, d'Anna M, et al. KRAS detection on archival cytological smears by the novel fully automated polymerase chain reaction-based Idylla mutation test[J]. *Cytojournal*, 2017, 14: 5. DOI: 10.4103/1742-6413.200936.
 - [13] Jones JC, Renfro LA, Al-Shamsi HO, et al. Non-V600 BRAF mutations define a clinically distinct molecular subtype of metastatic colorectal cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(23): 2624-2630. DOI: 10.1200/JCO.2016.71.4394.
 - [14] 彭健, 陈颖, 董先龙, 等. KRAS 基因突变与结直肠癌患者临床病理特征及预后的关系[J]. *中华消化外科杂志*, 2018, 17(2): 143-147. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2018.02.005.
 - [15] Chang KL, Lee MY, Chao WR, et al. The status of Her2 amplification and Kras mutations in mucinous ovarian carcinoma[J]. *Hum Genomics*, 2016, 10(1): 40. DOI: 10.1186/s40246-016-0096-9.
 - [16] Bera AK, Lu J, Wales TE, et al. Structural basis of the atypical activation mechanism of KRASV14I[J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(38): 13964-13972. DOI: 10.1074/jbc.RA119.009131.
 - [17] Tyner JW, Erickson H, Deininger MW, et al. High-throughput sequencing screen reveals novel, transforming RAS mutations in myeloid leukemia patients[J]. *Blood*, 2009, 113(8): 1749-1755. DOI: 10.1182/blood-2008-04-152157.
 - [18] 谢玲, 陈劫, 孙怡, 等. 中国结直肠癌、肺癌和胃癌患者 KRAS 基因突变情况分析[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2016, 32(2): 210-213. DOI: 10.13315/j.cnki.cjcep.2016.02.022.
 - [19] Modest DP, Ricard I, Heinemann V, et al. Outcome according to KRAS-, NRAS- and BRAF-mutation as well as KRAS mutation variants: pooled analysis of five randomized trials in metastatic colorectal cancer by the AIO colorectal cancer study group[J]. *Ann Oncol*, 2016, 27(9): 1746-1753. DOI: 10.1093/annonc/mdw261.
 - [20] Ye ZL, Qiu MZ, Tang T, et al. Gene mutation profiling in Chinese colorectal cancer patients and its association with clinicopathological characteristics and prognosis[J]. *Cancer Med*, 2020, 9(2): 745-756. DOI: 10.1002/cam4.2727.
 - [21] Al-Shamsi HO, Jones J, Fahmawi Y, et al. Molecular spectrum of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA, TP53, and APC somatic gene mutations in Arab patients with colorectal cancer: determination of frequency and distribution pattern[J]. *J Gastrointest Oncol*, 2016, 7(6): 882-902. DOI: 10.21037/jgo.2016.11.02.
 - [22] Baldus SE, Schaefer KL, Engers R, et al. Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(3): 790-799. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2446.
 - [23] Ciceas J, Tamosaitis L, Kvederaviciute K, et al. KRAS, NRAS and BRAF mutations in colorectal cancer and melanoma[J]. *Med Oncol*, 2017, 34(2): 26. DOI: 10.1007/s12032-016-0879-9.
 - [24] Forbes SA, Beare D, Gunasekaran P, et al. COSMIC: exploring the world's knowledge of somatic mutations in human cancer[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(Database issue): D805-D811. DOI: 10.1093/nar/gku1075.
 - [25] Lai E, Pretta A, Impera V, et al. BRAF-mutant colorectal cancer, a different breed evolving[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2018, 18(6): 499-512. DOI: 10.1080/14737159.2018.1470928.
 - [26] Sanz-Garcia E, Argiles G, Elez E, et al. BRAF mutant colorectal cancer: prognosis, treatment, and new perspectives[J]. *Ann Oncol*, 2017, 28(11): 2648-2657. DOI: 10.1093/annonc/mdx401.
 - [27] Middleton G, Yang Y, Campbell CD, et al. BRAF-mutant transcriptional subtypes predict outcome of combined BRAF, MEK, and EGFR blockade with dabrafenib, trametinib, and panitumumab in patients with colorectal cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2020, pii: clincanres.3579. 2019. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-3579[Epub ahead of print].
 - [28] Kawazoe A, Shitara K, Fukuoka S, et al. A retrospective observational study of clinicopathological features of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in Japanese patients with metastatic colorectal cancer[J]. *BMC Cancer*, 2015, 15: 258. DOI: 10.1186/s12885-015-1276-z.
 - [29] Garcia-Carbonero N, Martinez-Useros J, Li W, et al. KRAS and BRAF mutations as prognostic and predictive biomarkers for standard chemotherapy response in metastatic colorectal cancer: a single institutional study[J]. *Cells*, 2020, 9(1). pii: E219. DOI: 10.3390/cells9010219.
 - [30] Gonsalves WI, Mahoney MR, Sargent DJ, et al. Patient and tumor characteristics and BRAF and KRAS mutations in colon cancer, NCCTG/Alliance N0147[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2014, 106(7). pii: dju106. DOI: 10.1093/jnci/dju106.
 - [31] 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. DOI: 10.3748/wjg.v21.i5.1595.

- [32] Guo TA, Wu YC, Tan C, et al. Clinicopathologic features and prognostic value of KRAS, NRAS and BRAF mutations and DNA mismatch repair status: a single-center retrospective study of 1,834 Chinese patients with stage I-IV colorectal cancer[J]. Int J Cancer, 2019, 145(6):1625-1634. DOI:10.1002/ijc.32489.
- [33] Martinelli E, Cardone C, Troiani T, et al. Clinical activity and tolerability of FOLFIRI and cetuximab in elderly patients with metastatic colorectal cancer in the CAPRI-GOIM first-line trial[J]. ESMO Open, 2017, 1(6):e000086. DOI: 10.1136/esmoopen-2016-000086.
- [34] Pietrantonio F, Petrelli F, Coinu A, et al. Predictive role of BRAF mutations in patients with advanced colorectal cancer receiving cetuximab and panitumumab; a meta-analysis[J]. Eur J Cancer, 2015, 51(5):587-594. DOI:10.1016/j.ejca.2015.01.054.
- [35] Benson AB, Venook AP, Al-Hawary MM, et al. NCCN guidelines insights: colon cancer, Version 2. 2018[J]. J Nat Compr Canc Netw, 2018, 16(4):359-369. DOI:10.6004/jnccn.2018.0021.
- [36] Van Cutsem E, Lenz HJ, Köhne CH, et al. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer[J]. J Clin Oncol, 2015, 33(7):692-700. DOI: 10.1200/JCO.2014.59.4812.

(收稿日期: 2020-01-16)

本文引用格式

李艳艳, 高静, 吉聪聪, 等. 结直肠癌 KRAS、NRAS 和 BRAF 基因罕见突变类型及其临床意义(附 1 513 例)[J]. 中华消化外科杂志, 2020, 19(3):315-323. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2020.03.018.

Li Yanyan, Gao Jing, Ji Congcong, et al. Infrequent gene mutations of KRAS, NRAS and BRAF in colorectal cancer and their clinical significance: a report of 1 513 cases[J]. Chin J Dig Surg, 2020, 19(3):315-323. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2020.03.018.

• 读者 • 作者 • 编者 •

中华医学会系列杂志关于伦理委员会的审批 以及知情同意的规范

在临床试验研究中涉及人体数据的研究时,应该在文中说明所采用的试验程序是否已经通过伦理审查委员会(单位或国家)的评估,并著录其审批文号;如果没有正式的伦理委员会,则应在文中描述该研究是否符合 2013 年修订的《赫尔辛基宣言》(www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html)的要求。通常情况下,涉及人的研究包括以下几种:

- (1) 针对个体采取干预措施,获得相关安全性和(或)有效性的信息:如药物、医疗器械、手术疗法、健康宣教等。
- (2) 与个体直接接触,通过采血或组织标本、访谈或调查问卷等形式收集个人信息。
- (3) 收集既往保存的个人信息,涉及隐私且可辨别个人身份。

中华医学会杂志社
2018 年 5 月