

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.01.001

结直肠癌组织中 MMR 蛋白表达、MSI、RAS 和 BRAF 基因突变与临床病理特征的关系*

向林果, 谭憬一, 姚 远, 孙雪琴, 张阳丽[△]

重庆医科大学附属第一医院临床分子医学检测中心, 重庆 400016

摘要:目的 探讨结直肠癌患者癌组织中错配修复(MMR)蛋白表达、微卫星不稳定性(MSI)、大鼠肉瘤(RAS)基因和致癌同源体 B1(BRAF)基因突变与临床病理特征的关系。方法 选取该院 2022 年 1—12 月接受根治手术治疗的 352 例结直肠癌患者的肿瘤组织和血液标本、42 例非肠癌患者的实体瘤组织和血液标本, 采用免疫组化法检测 MMR 蛋白表达, 一代测序片段分析法检测 MSI, 实时荧光定量聚合酶链反应检测 KRAS、NRAS 和 BRAF 基因突变状态, 分析 MMR 蛋白表达、MSI 和 3 种基因突变状态与结直肠癌临床病理特征的关系。结果 352 例 CRC 患者肿瘤组织中检出 MMR 缺陷(dMMR)29 例(8.2%), 高度微卫星不稳定(MSI-H)26 例(7.4%), KRAS 基因突变 161 例(45.7%), NRAS 基因突变 13 例(3.7%), BRAF 基因突变 11 例(3.1%)。与 dMMR 有关因素为低龄、黏液腺癌、原发于右半结肠癌($P < 0.05$); 与 MSI-H 相关因素包括低龄、肿瘤家族史、原发于右半结肠癌($P < 0.05$); KRAS 和 NRAS 基因高突变率分别与黏液腺癌和淋巴结转移有关($P < 0.05$); BRAF 基因高突变率与低分化和原发于右半结肠癌有关($P < 0.05$)。BRAF 基因突变与 dMMR 和 MSI-H 有关($P < 0.05$)。结论 MMR 蛋白表达, MSI, 以及 KRAS、NRAS 和 BRAF 基因突变与不同的临床病理特征有关。通过这 5 种分子标志物的联合检测可以对肿瘤进行分子分型, 进一步为结直肠癌患者的个体化精准诊疗提供理论依据。

关键词:结直肠癌; 大鼠肉瘤基因; 致癌同源体 B1 基因; 错配修复蛋白; 微卫星不稳定性; 基因突变
中图分类号:R735.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2024)01-0001-07

Relationship between mismatch repair protein expression, MSI, RAS and BRAF gene mutation in colorectal cancer tissues with clinicopathological characteristics*

XIANG Linguo, TAN Jinyi, YAO Yuan, SUN Xueqin, ZHANG Yangli[△]

Clinical Molecular Medical Detection Center, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Abstract: Objective To investigate the relationship between the mismatch repair protein (MMR protein) expression, microsatellite instability (MSI), rat sarcoma gene (RAS) and carcinogenic homolog B1 gene (BRAF) gene mutation in colorectal cancer (CRC) tissues with the clinicopathologic features. **Methods** The tumor tissue and blood samples in 352 patients with colorectal cancer receiving the radical operation treatment and the mass tumor tissue and blood samples in 42 patients with non-intestinal cancer in this hospital from January to December 2022 were collected. The immunohistochemistry was used to detect the MMR protein, the first generation sequencing fragment analysis was performed to detect MSI, and the real-time quantitative PCR was used to detect the gene mutation status of KRAS, NRAS and BRAF. The relationship between MMR protein expression, MSI and three gene mutation states with the clinicopathologic features of CRC was analyzed. **Results** In the tumor tissues of 352 patients with CRC, the 29 cases (8.2%) of MMR (dMMR) and 26 cases (7.4%) of MSI-H were detected respectively. The mutation rates of KRAS, NRAS, BRAF genes were 45.7% (161 cases), 3.7% (13 cases) and 3.1% (11 cases), respectively. The factors associated with dMMR were the age, mucinous carcinoma and originated from right-sided colon cancer. The factors associated with MSI-H included the low age, family tumor history and originated from right-sided colon cancer ($P < 0.05$). High mutation rates of KRAS and NRAS genes were related with mucinous adenocarcinoma and lymph node metastasis, respectively. High BRAF mutation rate was associated with poor differentiation and originated

* 基金项目:重庆市科卫联合医学科研项目(2020FYYX145)。

作者简介:向林果,女,技师,主要从事临床检验诊断新技术研究。△ 通信作者, E-mail:346170823@qq.com。

网络首发 [http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20231130.1627.002.html\(2023-12-04\)](http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20231130.1627.002.html(2023-12-04))

from fright-sided colon cancer ($P < 0.05$). The BRAF gene mutation was related with dMMR and MSI-H. **Conclusion** The MMR protein expression, MSI status, and the gene mutations of KRAS, NRAS and BRAF are correlated with different clinicopathologic features. The combined detection of these five molecular markers could be used to classify the tumor molecules, which further provides the theoretical basis for the individualized precision diagnosis and treatment of the patients with CRC.

Key words: colorectal cancer; rat sarcoma gene; carcinogenic homolog B1 gene; mismatch repair protein; microsatellite instability; gene mutation

结直肠癌(CRC)是我国常见的恶性肿瘤之一,其发病率和病死率分别位于恶性肿瘤的第2位和第5位,且呈逐渐上升趋势^[1]。CRC的发生、发展涉及多个基因和多条细胞信号传导通路,是由一系列复杂的遗传和表观遗传事件逐步累积所致^[2-3]。相关分子标志物的检测不仅可作为CRC筛查的有效补充,还在用药方案选择、预后判断及疗效预测等方面起到关键作用。

错配修复(MMR)蛋白、微卫星不稳定性(MSI)、大鼠肉瘤(RAS)基因和致癌同源体B1(BRAF)基因突变已被公认是影响CRC患者个体化治疗策略的主要标志物^[4]。此前虽有研究报道了关于MMR蛋白、MSI、RAS和BRAF基因在CRC患者中的表达情况,但由于病例纳入标准的差异,标志物组合不同和临床资料的覆盖度不同以及样本量的限制,研究结果不尽相同^[5-6]。因此,本研究分析了352例CRC患者的病理标本和详细的临床资料,旨在更完整地探讨MMR

蛋白表达、MSI、RAS(含KRAS和NRAS)基因和BRAF基因突变与各临床病理特征的关系,以及RAS和BRAF基因分别与MMR蛋白表达和MSI的关系,为CRC患者的个体化治疗提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院2022年1—12月352例病理诊断明确、临床病历资料完整患者(CRC组)的CRC组织和血液标本,以及42例非CRC的其他实体瘤患者(非CRC组)癌组织和血液标本。非CRC的其他实体瘤包括胆管癌、肝癌、卵巢癌、胰腺癌、肺癌等共计42例。所有患者未接受放化疗、靶向或免疫治疗,未合并其他肿瘤。患者和家属对本次研究均知情同意,并签署知情同意书。本研究通过本院医学伦理委员会的审核批准(伦理审批号:K2023-566号)。CRC组和非CRC组研究对象之间性别、年龄、病理特征等比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。见表1。

表1 两组患者的临床及病理特征比较[n(%)]

组别	n	性别		年龄(岁)		高血压史		糖尿病史		吸烟史		饮酒史	
		男	女	≤50	>50	有	无	有	无	有	无	有	无
CRC组	352	201(57.1)	151(42.9)	51(14.5)	301(85.5)	86(24.4)	266(75.6)	53(15.1)	299(84.9)	97(27.6)	255(72.4)	78(22.2)	274(77.8)
非CRC组	42	22(52.4)	20(47.6)	5(11.9)	37(88.1)	5(11.9)	37(88.1)	5(11.9)	37(88.1)	11(26.2)	31(73.8)	4(9.5)	38(90.5)
χ^2		0.340		0.205		3.315		0.297		0.035		3.635	
P		0.560		0.650		0.069		0.586		0.851		0.057	

组别	n	肿瘤家族史		分化程度		TNM分期(期)		淋巴结转移		远处转移	
		有	无	中+高分化	低分化	I+II	III+IV	有	无	有	无
CRC组	352	39(11.1)	313(88.9)	290(82.4)	62(17.6)	185(52.6)	167(47.4)	149(42.3)	203(57.7)	50(14.2)	302(85.8)
非CRC组	42	4(9.5)	38(90.5)	30(71.4)	12(28.6)	19(45.2)	23(54.8)	21(50.0)	21(50.0)	10(23.8)	32(76.2)
χ^2		0.002		2.954		0.805		0.900		2.682	
P		0.965 ^a		0.086		0.370		0.343		0.102	

注:^a为连续性校正 χ^2 检验。

1.2 仪器与试剂 仪器:全自动免疫组化染色仪(Dakocytomation)、基因测序仪(ABI 3500Dx)、荧光定量PCR仪(SLAN 96S)、移液器(Eppendorf)、紫外分光光度计(NanoDrop One)、全自动核酸提取仪(奥盛 Auto-Pure 32A)、涡旋混匀器(其林贝尔 QB-328)、微型高速离心机(Mini-15K)、恒温金属浴(奥盛 MiniT-H2C)。试剂:友芝友人类KRAS基因7种突

变检测试剂盒、人类NRAS基因突变检测试剂盒、人类BRAF基因V600E突变检测试剂盒、新百基FFPE核酸提取或纯化试剂盒、桐树MSI检测试剂盒、福州迈新抗体。

1.3 方法

1.3.1 MMR蛋白表达检测 使用全自动免疫组化染色仪检测394例癌组织标本MMR蛋白(含

MSH2、MSH6、MLH1、PMS2)表达。MSH2、MSH6、MLH1 和 PMS2 四者均表达为(+)判断为错配修复功能完整(pMMR),任意一种表达为(-)则判为错配功能修复缺陷(dMMR)。

1.3.2 KRAS、NRAS 和 BRAF 基因突变检测 每个癌组织标本制备 3 张 8 μm 厚的石蜡切片用于核酸提取,1 张 4 μm 白片用于 HE 染色。HE 染色后由两位病理医师镜下阅片标识出肿瘤细胞比例>20%的区域。于 HE 染色片肿瘤富集区域刮取 3 张白片对应区域组织用于 DNA 提取。采用全自动核酸提取仪进行 DNA 提取并采用紫外分光光度计测得 DNA 标本的浓度和纯度。采用实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)技术检测标本 DNA 中 KRAS 基因第 2 外显子,NRAS 基因第 2、3、4 号外显子,BRAF 基因第 15 号外显子的热点突变。DNA 标本的提取、稀释、加样、扩增程序和结果判读均严格按照试剂盒说明书进行。

1.3.3 MSI 检测 采用一代测序片段分析法(荧光 PCR-毛细管电泳法),使用 MSI 检测试剂盒对所有患者肿瘤组织和血液标本进行 MSI 检测。试剂盒覆盖 5 个 MS 位点(BAT-25、BAT-26、D5S346、D2S123、D17S250)。结果判定:≥2 个 MS 位点不稳定为高度微卫星不稳定(MSI-H);1 个 MS 位点不稳定为低度微卫星不稳定(MSI-L);若 5 个 MS 位点均稳定,则为微卫星稳定(MSS)。

1.4 统计学处理 采用 SPSS25.0 统计软件处理和分析数据。计数资料采用例数或百分率表示,突变状

态及临床特征单因素分析采用 χ^2 检验,当理论数 $1 \leq T < 5$ 时用连续性校正 χ^2 检验;当 $T < 1$ 或 $n \leq 40$ 时,用 Fisher 确切概率法;多因素 Logistic 回归分析基于单因素分析结果。采用一致性检验(Kappa 值)统计分析免疫组化法检测 MMR 蛋白和荧光 PCR-毛细管电泳法检测 MSI 结果的一致性程度:Kappa 值<0 表示极差;0~0.2 表示微弱;>0.2~0.4 表示弱;>0.4~0.6 表示中度;>0.6~0.8 表示高度;>0.8~1.0 表示极强。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MMR 蛋白表达,MSI,KRAS、NRAS、BRAF 基因突变情况 352 例 CRC 患者中 dMMR 检出率为 8.2%,4 种 MMR 蛋白(MSH2、MSH6、MLH1、PMS2)的缺陷检出率分别为 0.9%、1.7%、4.5%和 6.8%。MSI-H 检出 26 例,MSI-L 检出 3 例,MSS 共 323 例。

KRAS、NRAS、BRAF 基因突变率依次为 45.7%、3.7%、3.1%;NRAS 基因只检出 G12D 和 Q61R 位点突变,未发现 KRAS、NRAS、BRAF 基因之间存在交叉突变。42 例非 CRC 的肿瘤患者 dMMR 检出率、MSI-H 检出率、KRAS 和 NRAS 基因突变率依次为 2.4%、4.8%、23.8%、2.4%,未检出 BRAF 基因突变。与非 CRC 组相比,CRC 组的 KRAS 基因突变率显著升高($P < 0.05$),两组 MMR 蛋白表达,MSI,NRAS 和 BRAF 基因突变情况比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 dMMR,MSI-H 以及 KRAS、NRAS、BRAF 常见基因突变类型分析[n(%)]

组别	n	dMMR					MSI-H
		MSH2 缺陷	MSH6 缺陷	MLH1 缺陷	PMS2 缺陷	合计	
CRC 组	352	3(0.9)	6(1.7)	16(4.5)	24(6.8)	29(8.2)	26(7.4)
非 CRC 组	42	1(2.4)	0(0.0)	0(0.0)	1(2.4)	1(2.4)	2(4.8)
χ^2				1.092			0.095
P				0.296 ^a			0.758 ^a

组别	n	KRAS 基因突变							NRAS 基因突变			BRAF 基因突变	
		G12C	G12S	G12R	G12V	G12D	G12A	G13D	合计	G12D	Q61R	合计	V600E
CRC 组	352	13(3.7)	11(3.1)	1(0.3)	31(8.8)	64(18.2)	10(2.8)	31(8.8)	161(45.7)	7(2.0)	6(1.7)	13(3.7)	11(3.1)
非 CRC 组	42	1(2.4)	0(0.0)	0(0.0)	5(11.9)	3(7.1)	0(0.0)	1(2.4)	10(23.8)	0(0.0)	1(2.4)	1(2.4)	0(0.0)
χ^2					7.346						<0.001		—
P					0.007						>0.999 ^a		0.616 ^b

注:^a 为连续性校正 χ^2 检验;^b 为 Fisher 确切概率法;—表示无数据。

2.2 不同临床病理特征 CRC 癌组织中 MMR 蛋白表达,MSI,KRAS、NRAS、BRAF 基因突变状态 352 例 CRC 患者的 5 种分子标志物与临床病理特征关系的分析结果显示:年龄≤50 岁、黏液腺癌、原发于右半结肠的患者 dMMR 检出率更高($P < 0.05$);

MSI-H 多见于年龄≤50 岁、有肿瘤家族史、黏液腺癌、原发于右半结肠、TNM 分期 I + II 期、无淋巴结转移的患者($P < 0.05$)。KRAS 基因高突变率的临床特征表现为女性、无吸烟史、黏液腺癌($P < 0.05$); NRAS 基因仅在在有淋巴结转移的患者中突变率升高

($P < 0.05$); BRAF 基因突变率在低分化和原发于右半结肠的患者中更高($P < 0.05$)。见表 3。

将单因素分析中差异有统计学意义的变量纳入多因素 Logistic 回归模型。由于在单因素分析中只有淋巴结转移与 NRAS 基因突变有关,因此在多因素

分析中排除了 NRAS 基因突变。多因素 Logistic 回归分析结果显示,黏液腺癌患者更易发生 KRAS 基因突变($P < 0.05$);低龄、有肿瘤家族史的右半结肠癌患者更易表现出 MSI-H($P < 0.05$);dMMR 和 BRAF 基因突变多因素分析结果与单因素分析一致。见表 4。

表 3 不同临床特征下 MMR 蛋白表达,MSI,KRAS,NRAS,BRAF 基因突变情况分析[n(%)]

项目	n	MMR 蛋白			MSI			KRAS 基因			NRAS 基因			BRAF 基因		
		dMMR	χ^2	P	MSI-H	χ^2	P	突变	χ^2	P	突变	χ^2	P	突变	χ^2	P
性别																
男	201	20(10.0)	1.816	0.178	15(7.5)	0.004	0.950	81(40.3)	5.587	0.018	10(5.0)	2.165	0.141	8(4.0)	0.569	0.451 ^a
女	151	9(6.0)			11(7.3)			80(53.0)			3(2.0)			3(2.0)		
年龄(岁)																
≤50	51	9(17.6)	5.604	0.018 ^a	10(19.6)	11.017	0.001 ^a	21(41.2)	0.500	0.479	1(2.0)	0.095	0.758 ^a	1(2.0)	0.007	0.935 ^a
>50	301	20(6.6)			16(5.3)			140(46.5)			12(4.0)			10(3.3)		
高血压史																
有	86	5(5.8)	0.885	0.347	4(4.7)	1.245	0.265	40(46.5)	0.027	0.869	2(2.3)	0.198	0.657 ^a	2(2.3)	0.018	0.894 ^a
无	266	24(9.0)			22(8.3)			121(45.5)			11(4.1)			9(3.4)		
糖尿病史																
有	53	5(9.4)	0.005	0.942 ^a	4(7.5)	<0.001>	0.999 ^a	21(39.6)	0.940	0.332	4(7.5)	1.486	0.223 ^a	1(1.9)	0.018	0.894 ^a
无	299	24(8.0)			22(7.4)			140(46.8)			9(3.0)			10(3.3)		
吸烟史																
有	97	10(10.3)	0.759	0.384	7(7.2)	0.006	0.940	34(35.1)	6.162	0.013	4(4.1)	<0.001>	0.999 ^a	5(5.2)	1.014	0.314 ^a
无	255	19(7.5)			19(7.5)			127(49.8)			9(3.5)			6(2.4)		
饮酒史																
有	78	8(10.3)	0.540	0.463	6(7.7)	0.014	0.907	32(41.0)	0.897	0.344	2(2.6)	0.067	0.796 ^a	3(3.8)	0.002	0.963 ^a
无	274	21(7.7)			20(7.3)			129(47.1)			11(4.0)			8(2.9)		
肿瘤家族史																
有	39	6(15.4)	1.995	0.158 ^a	8(20.5)	8.995	0.003 ^a	19(48.7)	0.157	0.692	0(0.0)	—	0.376 ^b	1(2.6)	<0.001>	0.999 ^a
无	313	23(7.3)			18(5.8)			142(45.4)			13(4.2)			10(3.2)		
病理类型																
普通腺癌	308	20(6.5)	8.165	0.004 ^a	19(6.2)	4.011	0.045 ^a	132(42.9)	8.243	0.004	12(3.9)	0.011	0.915 ^a	10(3.2)	<0.001>	0.999 ^a
黏液腺癌	44	9(20.5)			7(15.9)			29(65.9)			1(2.3)			1(2.3)		
分化程度																
中+高分化	290	21(7.2)	2.166	0.141	21(7.2)	<0.001>	0.999 ^a	136(46.9)	0.889	0.346	10(3.4)	0.024	0.876 ^a	3(1.0)	20.009	<0.001 ^a
低分化	62	8(12.9)			5(8.1)			25(40.3)			3(4.8)			8(12.9)		
原发部位																
左半结肠+直肠	272	17(6.3)	6.261	0.012	15(5.5)	6.129	0.013	119(43.8)	1.907	0.167	12(4.4)	0.962	0.327 ^a	5(1.8)	4.809	0.028 ^a
右半结肠	80	12(15.0)			11(13.8)			42(52.5)			1(1.3)			6(7.5)		
分期(期)																
I+II	185	18(9.7)	1.147	0.284	20(10.8)	6.685	0.010	78(42.2)	2.010	0.156	4(2.2)	2.570	0.109	3(1.6)	2.911	0.088
III+IV	167	11(6.6)			6(3.6)			83(49.7)			9(5.4)			8(4.8)		
淋巴结转移																
有	149	10(6.7)	0.797	0.372	5(3.4)	6.136	0.013	73(49.0)	1.103	0.294	10(6.7)	6.617	0.010	7(4.7)	1.307	0.253 ^a
无	203	19(9.4)			21(10.3)			88(43.3)			3(1.5)			4(2.0)		

续表 3 不同临床特征下 MMR 蛋白表达, MSI, KRAS, NRAS, BRAF 基因突变情况分析[n(%)]

项目	n	MMR 蛋白			MSI			KRAS 基因			NRAS 基因			BRAF 基因		
		dMMR	χ^2	P	MSI-H	χ^2	P	突变	χ^2	P	突变	χ^2	P	突变	χ^2	P
远处转移																
有	50	2(4.0)	0.809	0.369 ^a	2(4.0)	0.485	0.486 ^a	29(58.0)	3.530	0.060	1(2.0)	0.079	0.779 ^a	3(6.0)	0.677	0.411 ^a
无	302	27(8.9)			24(7.9)			132(43.7)			12(4.0)			8(2.6)		

注:^a为连续性校正 χ^2 检验; b 为 Fisher 确切概率法; - 表示无数据。

表 4 影响 MMR 蛋白表达, MSI, KRAS, BRAF 基因突变的多因素分析

项目	dMMR			MSI-H			KRAS 突变			BRAF 突变		
	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P	OR	95%CI	P
性别(女 vs. 男)							1.36	0.83~2.24	0.225			
年龄(≤ 50 岁 vs. > 50 岁)	2.83	1.17~6.85	0.022	4.68	1.80~12.17	0.002						
病理学类型(黏液腺癌 vs. 普通腺癌)	3.01	1.23~7.39	0.016	2.16	0.75~6.20	0.153	2.48	1.27~4.84	0.008			
原发部位(左半结肠+直肠 vs. 右半结肠)	0.41	0.18~0.92	0.030	0.31	0.12~0.76	0.011				0.23	0.06~0.82	0.024
分期(I+II 期 vs. III+IV 期)				2.23	0.26~19.40	0.468						
淋巴结转移(有 vs. 无)				0.51	0.05~5.13	0.569						
分化程度(高 vs. 低)										0.07	0.02~0.28	<0.001
肿瘤家族史(有 vs. 无)				4.62	1.70~12.54	0.003						
吸烟史(有 vs. 无)							0.67	0.38~1.17	0.157			

注:括号内 a vs. b 表示 a 同 b 比较, b 为参考, b 的 OR 赋值为 1。

2.3 不同 MMR 蛋白表达和 MSI 状态下 RAS 和 BRAF 基因突变情况 352 例 CRC 患者中, KRAS、BRAF 基因突变与 dMMR 有关, 与 pMMR 患者相比, dMMR 患者 KRAS 基因突变率降低而 BRAF 突

变率显著升高($P < 0.05$)。MSI-H 的患者同样具有更高的 BRAF 基因突变率($P < 0.05$), 而 KRAS 和 NRAS 基因突变率与 MSI 状态无关($P > 0.05$)。见表 5。

表 5 不同 MMR 蛋白表达和 MSI 状态下 RAS 和 BRAF 基因突变情况分析[n(%)]

项目	n	KRAS 突变	χ^2	P	NRAS 突变	χ^2	P	BRAF 突变	χ^2	P
dMMR	29	7(24.1)	5.942	0.015	2(6.9)	0.194	0.659 ^a	4(13.8)	8.351	0.004 ^a
pMMR	323	154(47.7)			11(3.4)			7(2.2)		
MSI-H	26	8(30.8)	2.535	0.111	0(0.00)	-	0.610 ^b	3(11.5)	3.906	0.048 ^a
MSI-L 及 MSS	326	153(46.9)			13(4.0)			8(2.5)		

注:^a为连续性校正 χ^2 检验; ^b为 Fisher 确切概率法; - 表示无数据。

2.4 MMR 蛋白检测与 MSI 检测一致性分析 将 MSS 和 MSI-L 划为一组, dMMR 对应 MSI-H, pMMR 对应 MSS 或 MSI-L, 分析免疫组化检测 MMR 和荧光 PCR-毛细管电泳法检测 MSI 结果的一致性。两组共 394 份标本中, MMR 蛋白检测和 MSI 检测结果相符的共有 378 例, 总体相符率为 95.9%, Kappa 一致性检验结果表明, 两种检测方法检测结果高度一致(Kappa=0.702, $P < 0.001$)。结果不一致标本中

有 9 例免疫组化检测为 dMMR, PCR-毛细管电泳结果为 MSS; 7 例 PCR-毛细管电泳结果为 MSI-H, 免疫组化显示 pMMR。

3 讨论

MMR 基因的主要功能是修复 DNA 复制和重组过程中的碱基错配, 以确保基因结构的稳定性, 其编码的最重要的蛋白家族包括 MSH2、MSH6、MLH1 和 PMS2。dMMR 可引起微卫星复制错误、不能被修

复,导致微卫星长度改变,从而表现为 MSI。既往研究已经证实,MMR 基因突变或高甲基化和 MSI 不仅是林奇综合征的主要原因,也是 CRC 的重要发病机制之一^[2,7]。本研究显示,dMMR 在 CRC 患者中的检出率为 8.2%,与之前报道 3%~13% 的亚洲 CRC 患者表现出 dMMR 状态的结果相符^[8];MSI-H 检出率为 7.4%,略低于 dMMR 检出率。在本研究中,与 dMMR 和 MSI-H 高检出率有关的共同临床病理因素为低龄和原发部位为右半结肠癌,表明 dMMR 和 MSI-H 与 CRC 疾病早发性和原发部位有关。也有研究报道,TNM 分期为 I~II 期的无淋巴结转移的 CRC 患者中 MSI-H 的发生率较高^[9-10],这与本研究中 MSI 的单因素分析结论相符。但在多因素 Logistic 回归分析中,与 MSI 相关因素排除了病理学类型、分期和淋巴结转移,显示有肿瘤家族史的患者更容易发生 MSI-H,黏液腺癌更容易发生 dMMR。

既往研究发现,dMMR 或 MSI-H 的 CRC 患者中 BRAF V600E 突变和 MLH1 启动子甲基化与散发性 CRC 密切相关^[11-12]。本研究显示,BRAF V600E 突变与 dMMR 和 MSI-H 密切相关,其突变率在 dMMR 和 MSI-H 患者中明显高于 pMMR 和非 MSI-H(MSS 和 MSI-L)患者。因此,当 CRC 患者单独检测到 MSI-H 或 MLH1 缺失时,有必要进行 BRAF 基因突变和(或)MLH1 启动子甲基化的后续检测,如有 BRAF V600E 突变则不能确诊为林奇综合征。有报道指出,在 dMMR 或 MSI-H 的转移性 CRC 患者中,若存在 BRAF 基因突变则提示生存率更差,而 RAS 基因突变可能与生存率无关^[13]。

尽管 MMR 蛋白表达和 MSI 反映的是同一生物学事件,但本研究中 MMR 蛋白表达和 MSI 与临床病理特征的关系仍存在略微不同,这可能是由于两种标志物检测结果不完全一致所致。同一标本出现免疫组化结果为 pMMR 而荧光 PCR-毛细管电泳法结果为 MSI-H 这种情况的原因:一方面可能是 MMR 蛋白的基因发生变异,这些变异虽不影响蛋白的抗原结构,但却能影响其 MMR 功能,导致微卫星位点 MMR 失败;另一方面可能是其他 MMR 蛋白(除外 MSH2、MSH6、MLH1 和 PMS2 这 4 种主要的 MMR 蛋白)的缺失亦会影响微卫星的稳定性,表现出 pMMR 而微卫星不稳定^[14]。当然,由于 MMR 蛋白之间存在功能重复(PMS2 和 PMS1、MSH6 和 MSH3),当孤立性的 MSH6 缺失时,MSH3 可以功能性替代部分 MSH6,活化 MMR 系统而继续保留 MSS 状态,从而表现为 dMMR 而 MSS^[14]。此外,免疫组化法依赖于染色过程,染色质量不佳会影响结果准确判读,同一份标本不同的切取角度也有可能造成两种检测结果不一致。因此,为提高检测准确性,不管是在林奇综合征的筛查时,还是 CRC 患者治疗指导时,建议进行 MMR 蛋白和 MSI 联合检测,相互补充。

表皮生长因子受体(EGFR)是临床上治疗 CRC 的主要靶点之一。KRAS、NRAS 和 BRAF 基因是 EGFR 依赖的下游丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路中的 3 个关键分子,这些基因的突变可导致 MAPK 通路的激活,促进大多数癌细胞增殖和抗凋亡,使 EGFR 受体抑制剂无效。临床研究表明,MSS、RAS 和 BRAF 基因野生型的转移性 CRC 患者能从抗 EGFR 单抗治疗中获益^[15]。本研究中 KRAS 基因第 2 外显子突变率为 45.7%,与文献^[16]报道结果相近。在单因素分析中,与 KRAS 基因突变有关的临床病理参数为女性、黏液腺癌和无吸烟史,但多因素 Logistic 回归分析显示,仅黏液腺癌是 KRAS 基因突变的独立影响因素。已有研究报道,由于 CRC 中 KRAS 等位基因的多样性,不同 KRAS 基因突变可能具有不同的预后,但导致预后不同的原因尚不清楚。其中 KRAS 基因第 2 外显子 12 号密码子 G12C 已被证明与较差的总生存率相关^[17-18]。NRAS 基因突变较少发生,本研究中 CRC 组 NRAS 基因突变检出率为 3.7%,有淋巴结转移的患者 NRAS 基因突变率高于无淋巴结转移者($P=0.010$),有肿瘤家族史和 MSI-H 的 CRC 患者未检测出 NRAS 基因突变。笔者推测 NRAS 突变可能与淋巴结转移、肿瘤家族史及 MSI 有一定关系,但因本次 NRAS 基因突变例数较少,有待增加病例数进一步分析证实。

BRAF 基因编码一种 RAF 激酶蛋白,参与调控细胞生长、增殖、分化和凋亡等过程,其突变状态与多种肿瘤的发生、发展和临床预后相关。BRAF 基因 V600E 突变往往被认为是肿瘤侵袭性的标志,与 BRAF 野生型相比,它是转移性 CRC 患者预后不良和总生存期更短的危险因素^[19]。本研究中,CRC 组 BRAF 基因 V600E 突变率为 3.1%,低于西方人群 8%~12% 的突变率^[20],但与之前报道的中国 CRC 患者 BRAF 基因突变率相当^[21],进一步证实 CRC 患者 BRAF 基因突变在中国和西方人群存在种族差异。本研究显示 BRAF 基因在低分化、原发于右半结肠的患者中突变率高,但未发现与淋巴结转移和远处转移等其他不良预后的临床病理特征有关。BRAF 和 RAS 基因同处于 RAS-RAF-MAPK 通路,突变结果相互排斥,本研究未发现 RAS 和 BRAF 基因同时发生突变。

毋庸置疑,MMR 蛋白,MSI,以及 KRAS、NRAS、BRAF 基因已经成为需要新辅助治疗和转移性 CRC 肿瘤患者的常规检测项目^[4]。随着分子诊断技术的飞速发展,适用于肿瘤早筛早诊的分子标志物也得到越来越多的关注和重视。硫酸类肝素蛋白多糖 2(SDC2)、隔膜蛋白 9(SEPT9)、组织因子通路抑制因子 2(TFPI2)基因被认为是潜在的 CRC 早筛分子标志物,特别是粪便标本 SDC2 基因甲基化检测,有望普及作为一种新的高灵敏度、高特异度的

CRC 辅助诊断方法^[22]。循环肿瘤细胞(CTC)检测也是一种理想的临床肿瘤液体活检技术,可提供 CRC 患者疾病状态的实时信息,有助于 CRC 的预后评估、治疗反应监测、复发转移风险评估等。

综上所述,本研究分析了 CRC 患者的 MMR 蛋白,MSI,以及 KRAS、NRAS、BRAF 基因共 5 个分子标志物,发现它们与多种临床病理特征相关。这些发现为 CRC 的临床诊断和个体化精准治疗提供了额外的支持。本研究也存在不足,缺乏这些患者的临床治疗和预后的数据,不能分析这些分子标志物与疗效或预后之间的关系,下一步将继续完善随访数据,进行更深入全面的探讨。

参考文献

- [1] XIA C, DONG X, LI H, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants[J]. *Chin Med J*, 2022, 135(5): 584-590.
- [2] JASMINE F, HAQ Z, KAMAL M, et al. Interaction between microsatellite instability (MSI) and tumor DNA methylation in the pathogenesis of colorectal carcinoma [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(19): 4956.
- [3] HARADA S, MORLOTE D. Molecular pathology of colorectal cancer[J]. *Adv Anat Pathol*, 2020, 27(1): 20-26.
- [4] 中国临床肿瘤学会(CSCO)结直肠癌专家委员会. 结直肠癌分子标志物临床检测中国专家共识[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2021, 24(3): 191-197.
- [5] KIM T W, HWANG S W, KIM K O, et al. The prognostic Utilities of DNA mismatch repair status and kras and braf mutation in korean colorectal cancer patients; the kasid multicenter study[J]. *Oncology*, 2023, 101(1): 49-58.
- [6] FAN J Z, WANG G F, CHENG X B, et al. Relationship between mismatch repair protein, RAS, BRAF, PIK3CA gene expression and clinicopathological characteristics in elderly colorectal cancer patients[J]. *World J Clin Cases*, 2021, 9(11): 2458-2468.
- [7] COHEN S A, PRITCHARD C C, JARVIK G P. Lynch syndrome: from screening to diagnosis to treatment in the era of modern molecular oncology[J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2019, 20: 293-307.
- [8] BATTAGLIN F, NASEEM M, LENZ H J, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer: overview of its clinical significance and novel perspectives[J]. *Clin Adv Hematol Oncol*, 2018, 16(11): 735-745.
- [9] ZHENG J, HUANG B, NIE X, et al. The clinicopathological features and prognosis of tumor MSI in East Asian colorectal cancer patients using NCI panel[J]. *Future Oncol*, 2018, 14(14): 1355-1364.
- [10] TOH J W T, PHAN K, REZA F, et al. Rate of dissemination and prognosis in early and advanced stage colorectal cancer based on microsatellite instability status: systematic review and meta-analysis[J]. *Int J Colorectal Dis*, 2021, 36(8): 1573-1596.
- [11] TOON C W, WALSH M D, CHOU A, et al. BRAF V600E immunohistochemistry facilitates universal screening of colorectal cancers for lynch syndrome[J]. *Am J Surg Pathol*, 2013, 37(10): 1592-1602.
- [12] LYNCH H T, LYNCH J F, LYNCH P M. Toward a consensus in molecular diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2007, 99(4): 261-263.
- [13] TAN E, WHITING J, XIE H, et al. BRAF mutations are associated with poor survival outcomes in advanced-stage mismatch repair-deficient/microsatellite high colorectal cancer[J]. *Oncologist*, 2022, 27(3): 191-197.
- [14] EVRARD C, TACHON G, RANDRIAN V, et al. Microsatellite instability: diagnosis, heterogeneity, discordance, and clinical impact in colorectal cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(10): 1567.
- [15] BILLER L H, SCHRAG D. Diagnosis and treatment of metastatic colorectal cancer: a review [J]. *JAMA*, 2021, 325(7): 669-685.
- [16] BELLIO H, FUMET J D, GHIRINGHELLI F. Targeting BRAF and RAS in Colorectal Cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(9): 2201.
- [17] ZHU G, PEI L, XIA H, et al. Role of oncogenic KRAS in the prognosis, diagnosis and treatment of colorectal cancer[J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1): 143.
- [18] JONES R P, SUTTON P A, EVANS J P, et al. Specific mutations in KRAS codon 12 are associated with worse overall survival in patients with advanced and recurrent colorectal cancer[J]. *Br J Cancer*, 2017, 116(7): 923-929.
- [19] SINICROPE F A. Evaluating the combination of microsatellite instability and mutation in braf as prognostic factors for patients with colorectal cancer[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2019, 17(3): 391-394.
- [20] 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.
- [21] YE Z L, QIU M Z, 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.
- [22] 张阳丽, 汲广岩, 胡登华, 等. 粪便 SDC2 基因甲基化检测在结直肠癌筛查中的应用价值[J]. *国际检验医学杂志*, 2023, 44(8): 961-965.

(收稿日期: 2023-04-16 修回日期: 2023-10-22)