

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.11.003

晚期结直肠癌患者血浆 cfDNA 中 *K-RAS* 突变 及与西妥昔单抗耐药的关系研究*

林琳, 庞雄昊, 梁文丽, 李美香

(广东省深圳市第二人民医院肿瘤科, 广东 深圳 518037)

摘要:目的 探讨晚期结直肠癌患者 cfDNA 中 *K-RAS* 的含量变化, 以及 *K-RAS* 与结直肠癌患者用药的关系及其预后价值。方法 选取晚期结直肠癌患者 100 例, 从 EDTA 血液样品获得血浆, 使用 ARMS-PCR 评估 *K-RAS* 突变等位基因, 收集病例, 并统计 *K-RAS* 突变状态与表皮生长因子受体(EGFR)单抗的药物疗效关系, 分析 *K-RAS* 基因突变对总生存期(OS)和无疾病生存期(PFS)的影响。结果 cfDNA 和组织中均检测出的 *K-RAS* 突变的一致性为 62.50%, 治疗前 *K-RAS* 在 cfDNA 中的突变丰度为 $(17.00 \pm 12.05)\%$, 经过标准治疗后为 $(8.10 \pm 7.98)\%$; 同样, 在组织中检测出, 治疗前 *K-RAS* 在组织中的突变丰度为 $(26.40 \pm 9.80)\%$, 经过标准治疗后为 $(12.60 \pm 2.55)\%$; *K-RAS* 野生型患者在使用 EGFR 单抗中会随着疾病的进展而出现 *K-RAS* 突变丰度增多的现象, 且 *K-RAS* 的表达情况与临床 PFS 和 OS 正相关。结论 血浆中 *K-RAS* 检测可指导临床用药, 具有一定预后判断价值。

关键词: 结直肠癌; 基因突变; *K-RAS*; 西妥昔单抗; 预后

中图分类号: R969.4; R979.1

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2018)11-0008-04

Relationship Between the *K-RAS* Mutation of cfDNA in Plasma and Cetuximab Resistance in Patients with Advanced Colorectal Cancer

Lin Lin, Pang Xionghao, Liang Wenli, Li Meixiang

(Department of Oncology, Shenzhen No. 2 People's Hospital, Shenzhen, Guangdong, China 518037)

Abstract: Objective To investigate the *K-RAS* content changes of cfDNA in patients with advanced colorectal cancer, and the relationship between *K-RAS* and drug use and its prognostic value. **Methods** Totally 40 patients with advanced colorectal cancer were selected, the plasma was obtained from EDTA blood samples, *K-RAS* mutations alleles were detected by ARMS-PCR. The patients were selected and the relationship between the *K-RAS* mutation status and the efficacy of EGFR monoclonal antibody was analyzed, the effects of *K-RAS* mutations on overall survival rate and disease free survival rate were analyzed. **Results** The consistency of *K-RAS* mutations detected in cfDNA and organizational was 62.50%. The abundance of *K-RAS* mutations in cfDNA was $(17.00 \pm 12.05)\%$ before treatment, which was $(8.10 \pm 7.98)\%$ after standard treatment. In the same way, the abundance of *K-RAS* mutations in the organization was $(26.40 \pm 9.80)\%$ before treatment, which was $(12.60 \pm 2.55)\%$ after standard treatment group. The abundance of *K-RAS* mutations was increased with the progress of disease in the use of EGFR monoclonal antibody in the *K-RAS* wild-typed patients, and the expression of *K-RAS* was positively correlated with clinical PFS and OS. **Conclusion** Detection of *K-RAS* in plasma can guide the clinical use of drugs and the value of prognosis.

Key words: colorectal cancer; gene mutation; *K-RAS*; cetuximab; prognosis

晚期结直肠癌是种异质性很大的疾病, 肿瘤细胞遗传的多样性和肿瘤细胞抗原表达的易变性^[1]为临床诊治带来很多挑战。临床 *K-RAS* 基因检测的开展, 为患者个体化治疗迈出重要一步。多项临床研究证实, 对于 *K-RAS* 野生型晚期结直肠癌患者, 化学治疗联合西妥昔单抗治疗有效率、无疾病进展时间和总生存时间均得到明显改善, 但西妥昔单抗治疗最终会出现进展^[2]。目前预测西妥昔单抗治疗耐药的指标不多, Musella 等^[3]研究发现, 循环肿瘤细胞的数目可以作为 *RAS-BRAF* 野生型晚期结直肠癌的预后指标, 并可预测西妥昔单抗治疗的失败。cfDNA 来源于肿瘤细胞的坏死或凋亡, 半衰期数小时, 能实时反映体内肿瘤状态, 并携带肿瘤特

异性基因改变, 检测手段相对成熟。Morgan 等^[4]研究发现, 相对于病理组织检测 *K-RAS* 突变, 通过 PCR kit 技术检测晚期结直肠癌患者血浆中携带 *K-RAS* 突变的 cfDNA 水平, 发现敏感性和特异性为 31% 和 97%, 可作为组织活检的补充。Thierry 等^[5]通过定量 PCR 技术检测晚期结直肠癌患者外周血中携带 *K-RAS* 突变的 cfDNA 水平与组织学中 *K-RAS* 突变情况, 发现 cfDNA 的敏感性和特异性为 92% 和 98%。因此, 通过检测晚期结直肠癌患者外周血血浆携带 *K-RAS* 突变的 cfDNA 水平在临床是可行的。为揭示检测结直肠癌患者血浆 cfDNA 的 *K-RAS* 突变情况和活组织检测的差异, 确定结直肠癌患者血浆 cfDNA 中的 *K-RAS* 突变

*基金项目: 广东省深圳市卫生计生系统科研项目[201507018]。

第一作者: 林琳, 女, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为肿瘤内科学, (电子信箱)wsk3558@126.com。

情况与西妥昔单抗治疗效果的关系,解决临床以影像学为主导的药物疗效和耐药判定问题,本研究中探讨了动态检测患者外周血血浆中携带 *K-RAS* 突变的 cfDNA 与患者预后的关系。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

纳入标准:经 CT 检查证实可测量的病灶;经病理组织学确诊,组织病理学检测结果为第Ⅳ期 mCRC;氟尿嘧啶、奥沙利铂和伊立替康治疗失败;体能状态评分(ECOG)为 0~2 分;各器官功能不存在明显缺陷;本研究经我院医学伦理委员会批准,所有患者签署知情同意书。

病例选择:选择医院 2015 年 6 月至 2017 年 6 月收治的经组织病理学确诊的晚期结直肠癌患者 100 例,男 67 例,女 33 例;年龄 62~78 岁,平均(69.48±7.76)岁;结肠癌 44 例,直肠癌 56 例;肝脏转移 26 例,肺转移 22 例,盆腔转移 19 例,纵隔淋巴结转移 18 例,骨转移 15 例。

1.2 方法

给药方案:西妥昔单抗注射液(Merck KGaA,进口药品注册证号 S20130004,规格每瓶为 20 mL:100 mg)静脉滴注 120 min,随后每周 250 mg/m² 持续静脉滴注 60 min,2 个月后改为 500 mg/m²,每 2 周 1 次,与化疗同时进行。给药前 30 min 常规给予组胺受体拮抗剂盐酸异丙嗪注射液(广东南国药业有限公司,国药准字 H44022504,规格为每支 2 mL:50 mg)25 mg 肌肉注射,地塞米松磷酸钠注射液(国药集团容生制药有限公司,国药准字 H41020036,规格为每支 5 mg:1 mL)5 mg 静脉注射,使用西妥昔单抗时行心电图监测。西妥昔单抗使用 60 min 后联合细胞毒药物。

FOLFIRI 方案:盐酸伊立替康注射液(江苏恒瑞医药股份有限公司,国药准字 H20061276,规格为每支 5 mL:100 mg)180 mg/m²,静脉滴注 30~90 min;亚叶酸钙注射液(江苏恒瑞医药股份有限公司,国药准字 H20020177,规格为每支 5 mL:50 mg)200 mg/m²,静脉滴注 2 h,第 1~2 天;5-氟尿嘧啶(5-FU,西南药业股份有限公司,国药准字 H50020128,规格为每支 10 mL:0.25 g)400 mg/m²,静脉注射,第 1 天,联合 5-FU 2 400 mg/m²,持续静脉泵入 46 h,14 d 为 1 个周期。所有患者使用化疗方案+表皮生长因子受体(EGFR)单抗治疗。治疗前后,检测患者血液和穿刺组织中样本的 *K-RAS* 突变状态,*K-RAS* 突变型患者使用标准化方案,野生型患者使用西妥昔单抗首次 400 mg/m² 持续。RECIST 版本 1.1 和 NCI-CTCAE 版本 4.0 用于检查研究中的终点。

血液收集:通过外周血液抽吸,将 7.5 mL 全静脉血收集在 EDTA 管(美国 BD 生物公司)中,保持于 4℃ 冰

箱直到分离,在收集后 1 h 内进行。将全血离心 10 min (4℃,820 g),并将血浆级分转移至 2 mL 冷试管(德国艾本得生物有限公司)中,再次离心 10 min(4℃,20 000 g),并在新鲜的 2 mL 管中回收纯血浆,于 -80℃ 下立即储存,直到 cfDNA 提取。

DNA 提取:根据说明书,使用 QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit(德国凯杰生物有限公司)从血浆中提取循环的无细胞 DNA。取 2 mL 血浆进行 cfDNA 提取,并在 50 μL 洗脱缓冲液中回收 cfDNA,4℃ 保存。

cfDNA 定量:通过使用 Qubit 2.0 荧光计(美国赛默飞世尔有限公司)的荧光测量法确定 cfDNA 的总量。通过 QIAamp 循环核酸试剂盒获得的 2 μL DNA 洗脱液,并根据说明书使用 Qubit dsDNA HS 测定试剂盒(美国赛默飞世尔有限公司)测定浓度。

K-RAS 突变检测和定量:为了鉴定 *K-RAS* 突变,回顾了 FFPE 肿瘤样品的 HE 染色载玻片,选择肿瘤组织进行分析。通过微观解剖去除来自 2 个未染色、5 μm 厚组织切片的相应组织,并通过在 TEN 缓冲液(1 mmol/L EDTA,10 mmol/L TRIS-HCl,0.1 mol/L NaCl,pH 8.0)中孵育将组织裂解,包括蛋白酶 K(20 g/L)过夜,62℃。将所得裂解物用于 PCR 反应,以扩增编码 *K-RAS* 外显子 2(密码子 12/13),外显子 3(密码子 59 和 61),以及 *K-RAS* 的外显子 4(密码子 117 和 146)的区域基因。将 3 μL 裂解液加入 47 μL PCR 反应中,包括 25 μL PCR Master Mix S(美国赛默飞世尔有限公司),0.5 μL 特异性 PCR 引物混合物(每个引物 25 pmol)和 21.5 μL Millipore H₂O。循环条件为,95℃ 5 min;2×[95℃ 30 s,62℃ 30 s,72℃ 30 s];2×[95℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 30 s];2×[95℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 30 s];35×[95℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 30 s];72℃ 10 min。在 1% 琼脂糖凝胶上分离 PCR 反应的一部分,以确保 *K-RAS* 区域的成功扩增。不同 *K-RAS* 的突变状态通过使用 PyroMark Q24 型测序仪(德国凯杰生物有限公司)的热测序确定密码子。根据 QIAGEN 的 pyro-sequencing 试剂的使用说明进行热解测序。所有引物的序列可根据要求提供。

1.3 统计学处理

应用 Graph Pad Prism 7 版本分析。除非另有说明,连续变量的结果以平均值±中值绝对偏差或平均值±标准误差表示,行 Student's *t* 检验或 Mann-Whitney *U* 检验;分类变量的比较行 Fisher 精确检验生存曲线行 Mantel-Cox 对数秩检验;相关分析由 Pearson 或 Spearman 相关分析进行。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 治疗前后 *K-RAS* 突变丰度对比

首先,在转移性 CRC 的初步诊断中,应用了 *K-RAS* 基因热点区域的 ARMS-PCR 检测 cfDNA 和肿瘤组织

中 *K-RAS* 突变情况。评估了外显子 2(密码子 12/13)、外显子 3(密码子 59 和 61)和外显子 4(密码子 117 和 146)的 *K-RAS* 状态,并鉴定了 82.50% (33/40),其中 cfDNA 和组织中均检测出的 *K-RAS* 突变的一致性为 62.50%。使用来自相应患者的 cfDNA 的 ARMS-PCR 技术对数据进行补充,结果见表 1。可见,cfDNA 可作为无法取到组织样本时的一种可行的检测方法。

表 1 治疗前后 cfDNA 的突变丰度比较 ($\bar{X} \pm s, \%$)

时间	cfDNA	肿瘤组织
治疗前	17.00 ± 12.05	26.40 ± 9.80
治疗后	8.10 ± 7.98	12.60 ± 2.55
<i>t</i> 值	9.287	11.486
<i>P</i>	<0.000 1	<0.000 1

2.2 *K-RAS* 状态与西妥昔单抗耐药间的关系分析

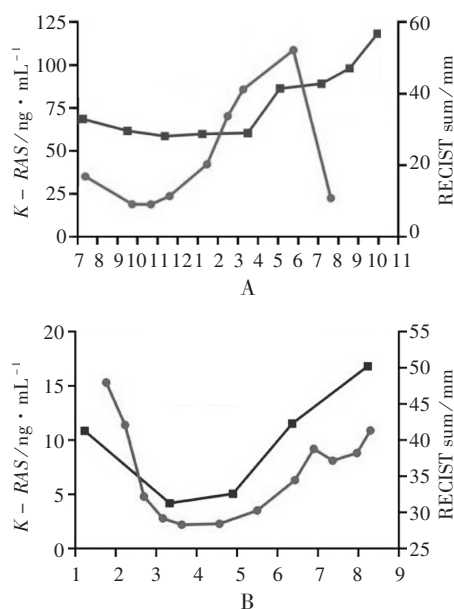
1 例患者中,原发肿瘤组织是 *K-RAS* 外显子 2-4 的野生型,同时 cfDNA 分析也证实了 *K-RAS* 表达为野生型,给予患者 FOLFIRI + 西妥昔单抗进行治疗,见图 1 A。在疾病进展后,检测到 *K-RAS* 呈现突变状态,且相较于传统的血清学和影像学检测,cfDNA 的检测更方便、准确,可实时动态监控患者的疾病状态。另 1 例患者,肿瘤组织也被确定为 *K-RAS* 外显子 2-4 的野生型,但 cfDNA 检测到的 *K-RAS* 3 号外显子突变,即是 Q61H,由于组织分析是当时 *K-RAS* 评估的标准,患者接受了 FOLFIRI + 帕尼单抗(患者自行购买)治疗。结果显示, *K-RAS* 突变在治疗开始后 1 个月,cfDNA 中并没有 *K-RAS* 突变,可能是由于采用细胞毒剂(伊立替康)治疗。约 5 个月后(即放射学确认的疾病进展前超过 2 个月),cfDNA 中再次检测到相同的突变,详见图 1 B。结果表明,与单次 cfDNA 定量相比,基于 cfDNA 的 *K-RAS* 筛查在治疗期间早期检测疾病进展有潜在价值,EGFR 单抗治疗中 *K-RAS* 的突变状态是导致耐药的重要因素。

2.3 *K-RAS* 状态与预后的关系

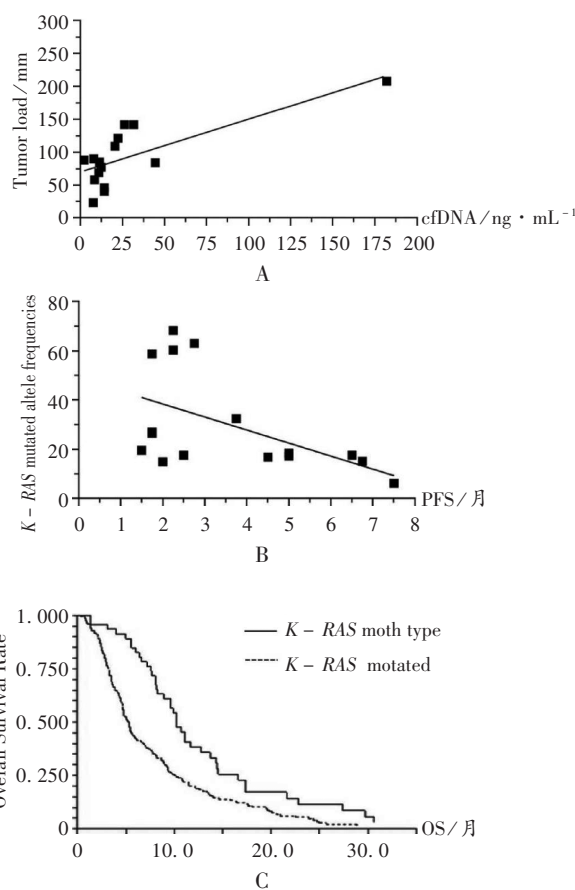
根据 cfDNA 中基因表达水平进行患者的生存分析已被用于多类型的癌症,汇总分析证实,cfDNA 中 *K-RAS* 水平升高的总生存期(OS)缩短。在肿瘤中肿瘤体积和肿瘤中 cfDNA 的含量存在正相关关系。详见图 2 A。*K-RAS* 的突变丰度在无疾病生存期(PFS)中有着显著差异($P=0.047$),见图 2 B。*K-RAS* 野生型患者和 *K-RAS* 突变型患者 OS 也存在显著差异,野生型患者中位 OS 为 10.2 个月(8.3~11.7)个月,突变型患者的中位 OS 为 5.2 个月(4.6~5.9)个月($HR=1.78, P=0.0006$),详见图 2 C。故 cfDNA 中 *K-RAS* 的状态和患者预后存在明显的相关性。

3 讨论

随着手术治疗、化学治疗、放射治疗等综合治疗手段



A. *K-RAS* 野生型在使用药物过程中 *K-RAS* 的变化
B. *K-RAS* 突变型在使用药物过程中 *K-RAS* 的变化
图 1 *K-RAS* 状态与西妥昔单抗耐药的关系



A. 肿瘤体积和肿瘤中 cfDNA 含量的变化 (Spearman $r=0.5630, P=0.0312$)
B. *K-RAS* 状态在总生存率中的变化 (Spearman $r=-0.0507, P=0.0470$)
C. *K-RAS* 状态在无疾病生存率中的变化

图 2 *K-RAS* 状态与预后的关系

的进步,早期结直肠癌患者的预后得到明显改善,但仍有 50% ~ 60% 的结直肠癌患者确诊时已伴远处转移。化疗药物及生物靶向药物的临床应用,晚期结直肠癌患者 OS 延长至 30 多个月以上,且提高了生活质量^[6]。

研究表明,患者待检测样品中可分离并分析特定的基因和肿瘤的关系^[7]。cfDNA 于 1948 年首次被描述,已作为潜在的癌症患者体征的说明^[8-10]。对于动态 cfDNA 分析,集中在临床相关的 2 个时间点,即治疗前和治疗后,可通过成像确定。本研究中,治疗前 cfDNA 中 *K-RAS* 的突变丰度呈明显变化,治疗前后组织中 *K-RAS* 突变丰度明显高于 cfDNA 中 *K-RAS*,组织中肿瘤细胞的含量更高,外周血中肿瘤细胞的含量相对低于肿瘤组织,故检测结果中存在细微差异。一致性方面,cfDNA 和肿瘤组织中同时检测的 *K-RAS* 突变比例达 62.50%,这与以往研究数据^[11-12]一致。因此,结直肠癌患者治疗过程中行 *K-RAS* 定量对肿瘤采取无创治疗方法具有指导意义。

K-RAS 基因的突变对于结直肠癌患者后续治疗方案的选择有重要意义。有研究显示,*K-RAS* 位于 EGFR 基因下游,对于 *K-RAS* 基因突变的患者,EGFR 单抗类药物获益程度不大^[13]。本研究中,在 EGFR 野生型患者,*K-RAS* 治疗前突变为 0,但随着治疗的深入,*K-RAS* 基因的突变丰度增加,特别是在再次发生疾病进展时突变丰度明显升高;同时,cfDNA 的检测方法相较于传统的影像学 and 血清学的检测更方便,且可检出突变的时间略微提前。目前,许多研究集中在 *K-RAS* 的发生和突变的复发 *K-RAS* 抗下等位基因 EGFR 治疗^[14-16]。但目前临床仍不清楚该如何处理这些结果。关于组织 cfDNA 之间发生 *K-RAS* 突变时如何选择,本研究结果显示,*K-RAS* 突变确实可在化疗加抗 EGFR 抗体的组合下消失,且在疾病进展时被再次检测出。因此,在某些情况下,明显的联合化疗也能抑制结直肠癌中的 *K-RAS* 突变。

基因突变与患者的无疾病生存率及总生存率存在一定的关系。本研究结果显示,*K-RAS* 突变的患者总生存率明显低于 *K-RAS* 野生型患者,且无疾病生存率也展现出类似结果,故对于肿瘤患者热点基因的检测就显得至关重要。晚期结直肠癌患者 *K-RAS* 的状态和临床用药及预后存在明显的相关性。

参考文献:

- [1] 鞠海星. 结直肠癌的遗传异质性与分子分型[J]. 中华结直肠疾病电子杂志,2015,4(4): 17-20.
- [2] 王 哲,孙玉秀,李皓静,等. 西安昔单抗联合化疗与单纯化疗治疗 *k-ras* 野生型晚期结直肠癌临床观察[J]. 肿瘤学杂志,2017,23(1): 45-48.
- [3] Musella V, Pietrantonio F, Di BE, et al. Circulating tumor cells as a longitudinal biomarker in patients with advanced chemorefractory, *RAS-BRAF* wild-type colorectal cancer receiving cetuximab or panitumumab[J]. International Journal of Cancer, 2015, 137(6): 1467-1474.
- [4] Morgan SR, Whiteley J, Donald E, et al. Comparison of *KRAS* Mutation Assessment in Tumor DNA and Circulating Free DNA in Plasma and Serum Samples[J]. Clin Med Insights Pathol, 2012, 5: 15-22.
- [5] Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, et al. Clinical validation of the detection of *KRAS* and *BRAF* mutations from circulating tumor DNA[J]. Nat Med, 2014, 20(4): 430-435.
- [6] García-Alfonso P, Ferrer A, Gil S, et al. Neoadjuvant and conversion treatment of patients with colorectal liver metastasis: the potential role of bevacizumab and other antiangiogenic agents[J]. Target Oncol, 2015, 11: 124-131.
- [7] Thierry AR, Mouliere F, El Messaoudi S, et al. Clinical validation of the detection of *KRAS* and *BRAF* mutations from circulating tumor DNA[J]. Nat Med, 2014, 20(4): 430-435.
- [8] Gormally E, Caboux E, Vineis P, et al. Circulating free DNA in plasma or serum as biomarker of carcinogenesis: practical aspects and biological significance[J]. Mutat Res, 2007, 635(2-3): 105-117.
- [9] Jung K, Fleischhacker M, Rabien A. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker - a critical appraisal of the literature[J]. Clin Chim Acta, 2010, 411(21-22): 1611-1624.
- [10] Spindler KL, Pallisgaard N, Andersen RF, et al. Circulating free DNA as biomarker and source for mutation detection in metastatic colorectal cancer[J]. PLoS One, 2015, 10(4): e0108247.
- [11] Szepechinski A, Chorostowska-Wynimko J, Struniawski R, et al. Cell-free DNA levels in plasma of patients with non-small-cell lung cancer and inflammatory lung disease[J]. Br J Cancer, 2015, 113(3): 476-483.
- [12] Szepechinski A, Rudzinski P, Kupis W, et al. Plasma cellfree DNA levels and integrity in patients with chest radiological findings: NSCLC versus benign lung nodules[J]. Cancer Lett, 2016, 374(2): 202-207.
- [13] 张惠锋,王昆华. *KRAS* 基因的突变状态对 EGFR 单抗治疗结直肠癌的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2016, 24(18): 2850-2855.
- [14] Marchese R, Muleti A, Pasqualetti P, et al. Low correspondence between *K-ras* mutations in pancreatic cancer tissue and detection of *K-ras* mutations in circulating DNA[J]. Pancreas, 2006, 32: 171-177.
- [15] Yen LC, Yeh YS, Chen CW, et al. Detection of *KRAS* oncogene in peripheral blood as a predictor of the response to cetuximab plus chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer[J]. Clin Cancer Res, 2009, 15: 4508-4513.
- [16] Spindler KL, Pallisgaard N, Andersen RF, et al. Gemcitabine and capecitabine for heavily pre-treated metastatic colorectal cancer patients - a phase II and translational research study[J]. Anti-cancer Res, 2014, 34(2): 845-850.

(收稿日期:2017-12-09;修回日期:2018-01-16)