

转移性结直肠癌中发生KRAS与BRAF基因同时突变的病例探究

潘洋滔 黄学锋

[摘要] 目的 探究转移性结直肠癌患者中KRAS与BRAF基因同时突变类型的治疗及其预后表现。方法 纳入114例转移性结直肠癌患者,采用二代测序的方法检测基因,分析KRAS与BRAF基因突变之间的关系;并通过PubMed检索回顾报道转移性结直肠癌患者的文献,进行治疗策略及预后分析。结果 KRAS基因在转移性结直肠癌患者中的突变率为46.49%(53/114);90.57%(48/53)的KRAS基因突变发生在第2外显子,其中以G12D突变最多,占49.06%(26/53)。BRAF基因的突变率为6.14%(7/114),主要为V600E突变,占57.14%(4/7)。KRAS与BRAF基因的突变表现为互斥($P<0.05$),但有1例罕见的KRAS与BRAF基因同时突变患者(KRAS第4外显子C351A>C/p.K117N与BRAF第11外显子C1397G>T/p.G466V)。回顾既往文献报道KRAS与BRAF基因同时突变患者共9例,5例选择了手术,其中3例联合化疗。文献中有5例患者报道生存期,结合本次研究报道的1例患者,转移性结直肠癌患者中KRAS与BRAF基因同时突变类型的平均生存时间为(259.00±76.80)d,中位生存期为(180.00±89.41)d。结论 转移性结直肠癌患者中,KRAS与BRAF基因突变表现为互斥,但存在小概率的KRAS与BRAF基因同时突变的罕见病例。这一罕见突变类型的相关治疗策略尚无定论,结合回顾既往病例报道的治疗经验,应以手术为主,结合化疗,总体来说预后不佳。

[关键词] KRAS; BRAF; 转移性结直肠癌; 基因突变

Concomitant KRAS/BRAF mutation in metastatic colorectal cancer PAN Yangtao, HUANG Xuefeng. Department of Colon and Rectal Surgery, Sir Run Run Shaw Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310016, China.

[Abstract] **Objective** To explore the treatment strategy and prognostic performance of concomitant KRAS and BRAF mutation in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC). **Methods** Totally 114 patients with mCRC were enrolled, and the genes were detected by the next-generation sequencing (NGS). The association between KRAS and BRAF mutation was analyzed. The mCRC cases with concomitant KRAS and BRAF mutation reported were collected by searching PubMed, the prognosis and treatment strategies were analyzed. **Results** The rate of KRAS mutation in mCRC was 46.49% (53/114), 90.57% (48/53) of KRAS mutation occurred in exon 2, of which G12D mutation accounted for 49.06% (26/53). The BRAF mutation rate in mCRC was 6.14% (7/114), mainly V600E mutation, accounting for 57.14% (4/7). Concomitant KRAS and BRAF mutation was mutually exclusive ($P<0.05$). However, a case with concomitant KRAS/BRAF mutation in an uncommon mutation site [KRAS exon 4 (C351A>C/p.K117N) and BRAF exon 11 (C1397G>T/p.G466V)] was identified. According to previous literature, there were 9 cases of concomitant KRAS and BRAF mutation reported, of which 5 cases chose surgery, and 3 cases received surgery combined with chemotherapy. As only 5 cases reported survival time, combining with the 1 patient in this study, the average overall survival time of mCRC patients with concomitant KRAS and BRAF mutation was (259.00±76.80) days, and the median survival time was (180.00±89.41) days. **Conclusion** Concomitant KRAS and BRAF mutations in mCRC is very rare, and mostly considered as mutually exclusive. Learning from experience of previous case reports, surgery combined with chemotherapy may be recommended, while the standard treatment strategy is still unclear. The prognosis of this

mutation is poor.

[Key words] BRAF; KRAS; metastatic colorectal cancer; mutation

DOI: 10.13558/j.cnki.issn1672-3686.2020.008.003

作者单位: 310016 浙江杭州, 浙江大学医学院附属邵逸夫医院肛肠外科

结直肠癌死亡率在恶性肿瘤中排名第三,超过半数的结直肠癌患者最终会发生转移^[1]。目前美国国立综合癌症网络/欧洲肿瘤医学学会指南推荐对转移性结直肠癌患者常规进行KRAS、NRAS及BRAF基因检测。有文献报道,KRAS基因的突变率在37%,而BRAF基因的突变率在6%^[2]。其中,大约有0.02%的结直肠癌患者存在KRAS与BRAF基因同时突变,而以往大多数研究认为KRAS与BRAF基因突变是互斥的^[3,4]。本次研究收集114例转移性结直肠癌患者,旨在验证KRAS与BRAF基因突变是否互斥,以及统计分析KRAS与BRAF基因的突变率、好发突变位点。并且,回顾目前已报道的KRAS与BRAF基因发生同时突变的患者资料,总结治疗策略以及预后转归。

1 资料与方法

1.1 一般资料 回顾性分析2018年7月到2019年7月间浙江大学医学院附属邵逸夫医院收治的114例转移性结直肠癌患者的KRAS/NRAS/BRAF等肿瘤相关基因检测结果。本次研究经过本院医学伦理委员会的授权,患者的隐私相关信息均经过了保护处理。所有送检基因检测的病理标本均由专业的病理科医生切片固定,并由专业的基因检测公司检测。纳入标准为:①根据美国国立综合癌症网络指南TNM分期,医院临床诊断为IV期结直肠癌,需要进行基因检测(不限定肿瘤位置及转移部位);②有可供基因检测的肿瘤标本(包括原发灶及转移灶),并至少进行了KRAS/NRAS/BRAF三个基因的全外显子检测。排除:①初步临床诊断为IV期,但术后病理诊断明确不属于IV期的结直肠癌患者;②基因检测结果无法查询到的患者;③未签署知情同意书的患者。

1.2 方法

1.2.1 基因检测 从经显微切割的石蜡包埋的肿瘤中提取DNA,然后用二代测序的方法进行至少KRAS/NRAS/BRAF三个肿瘤相关基因的全外显子检测,分析其KRAS/NRAS/BRAF等肿瘤相关基因的突变率及常见突变位点。

1.2.2 文献回顾 搜索2012年1月至2020年1月间PubMed上已报道的KRAS与BRAF基因同时突变的结直肠癌病例报道。对入选文献中报道的患者进一步的分析整理,剔除:①入选文献报道中患者未提及临床分期为符合美国国立综合癌症网络指南TNM分期的结直肠癌IV期,或者无法根据所报道

的患者资料得出临床分期为结直肠癌IV期的;②报道中患者未区分结直肠腺癌与肛管鳞癌或其他类型结直肠癌肿瘤的;③报道中患者未进行至少KRAS/NRAS/BRAF三个肿瘤相关基因的基因突变检测或者未报道检测结果的;④患者首诊时非同时性KRAS与BRAF基因突变,为KRAS继发BRAF突变,或BRAF继发KRAS突变。回顾整理出详细的突变位点,总结分析对应的治疗策略及预后。

1.3 统计学方法 采用SPSS 20.0统计学软件进行统计分析。KRAS/NRAS/BRAF等肿瘤相关基因突变之间的关联性采用Fisher精确概率法检验。生存分析采用Kaplan-Meier预后分析。设 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 114例转移性结直肠癌患者基因检测的结果 KRAS基因在114例转移性结直肠癌患者中的突变率为46.49%(53/114)。90.57%(48/53)的KRAS突变发生在第2外显子,主要为G12位点突变,占83.02%(44/53),其中G12D突变占49.06%(26/53),其次为G12V突变,占18.87%(10/53);5.66%(3/53)的KRAS突变发生在第3外显子;3.77%(2/53)的KRAS突变发生在第4外显子。BRAF基因的突变率为6.14%(7/114),其中85.71%(6/7)的BRAF突变发生在第15外显子,14.29%(1/7)的BRAF突变发生在第11外显子,且BRAF基因突变患者中V600E突变占57.14%(4/7),其次为D594N突变,占28.57%(2/7)。发现的1例第11外显子突变,其突变位点为G466V,并且该例患者同时伴发了KRAS第4外显子K117N位点突变。NRAS基因的突变率为7.02%(8/114)。40.35%(46/114)的患者KRAS/BRAF/NRAS三者皆无突变。114例转移性结直肠癌患者中检出的不同基因突变之间的关联性见图1。

由图1可见,KRAS与BRAF基因突变存在互斥($P < 0.05$),KRAS与NRAS基因突变存在互斥($P < 0.05$);LATS1与FBXW7基因突变存在强关联性($P < 0.05$),LATS1与SPEN基因突变,AKT1与KMT2D/ARID1A基因突变等,存在一定的关联性($P < 0.05$)。

2.2 KRAS与BRAF基因同时突变的病例报道 本次研究发现1例罕见的KRAS与BRAF基因同时突变患者,其突变的位点极其罕见,为KRAS第4外显子C351A>C/p.K117N与BRAF第11外显子C1397G>T/p.G466V同时突变。该例患者为59岁

女性,外院心脏换瓣术后1月,因“腹痛伴大量便血数天”急诊来我院。入院时血红蛋白为67 g/L,肠镜检查提示升结肠占位阻塞肠腔,病理明确为腺癌。胸腹部CT考虑存在腹膜、肝脏及肺部转移。患者存在肿瘤梗阻伴出血情况,多学科讨论建议先行手术解除症状,再全身化疗。手术中腹腔镜探查发现肿瘤局部不可切除,遂行末端回肠造口。术后行奥沙利铂+雷替曲塞化疗2次,复查考虑疾病进展,但腹痛及肿瘤出血较前改善。基因检测

结果完善后,改行伊利替康+雷替曲塞+贝伐化疗3次。复查考虑疾病稳定,但患者因化疗副反应拒绝继续化疗。给予瑞格菲尼160 mg口服,每天一次(28 d为一个用药周期,服药21 d,休息7 d),患者口服1月后自行停药,放弃继续治疗,疾病确诊6个月后去世。

2.3 文献回顾 共收集到文献报道的转移性结直肠癌KRAS与BRAF基因同时突变类型的患者9例,其突变位点、治疗策略、预后见表1。

表1 既往文献报道的KRAS并发BRAF突变患者的突变位点、治疗策略、预后

文献	KRAS突变位点	BRAF突变位点	MSI	治疗	总生存期/d
Halil 等 ^[3]	KRAS exon2 G12D	BRAF exon15 V600E	MSS	手术	NM
	KRAS exon2 G12D	BRAF exon15 V600E	MSS	NM	NM
	KRAS exon2 G12D	BRAF exon15 V600E	ND	NM	NM
Anusha 等 ^[5]	KRAS exon2 G12D	BRAF exon15 coden600	ND	FOLFOX	90
Larki 等 ^[6]	KRAS exon2 coden12	BRAF exon15 V600E	ND	NM	NM
Deshwar 等 ^[7]	KRAS exon2 G13D	BRAF exon15 V600E	MSS	FOLFOX+手术	485
	KRAS exon2 G12V	BRAF exon15 V600E	MSS	FOLFOX+手术	236
	KRAS exon2 G13D	BRAF exon15 D594N	MSS	手术	79
	KRAS exon2 G12S	BRAF exon11 G469A	NM	手术+FOLFOX	416

注:MSI代表通过PCR方式进行的微卫星不稳定状态检测,MSS代表微卫星稳定,FOLFOX代表结直肠癌治疗中以奥沙利铂、5-氟尿嘧啶为基础的化疗方案,ND代表未检测,NM代表未提及。

回顾文献报道,发现KRAS与BRAF基因同时突变的患者较为罕见,大部分文献报道认为KRAS与BRAF基因突变互斥。而仅有的既往文献报道的9例患者中,77.78%(7/9)的KRAS突变发生在第12外显子,其中44.44%(4/9)发生在G12D,其次为G13D,占22.22%(2/9)。88.89%(8/9)的BRAF突变发生在第15外显子,其中66.67%(6/9)发生在V600E。同时发生KRAS coden 12与BRAF coden 600突变的患者占总数的66.67%(6/9),其中33.33%(3/9)为KRAS G12D与BRAF V600E突变。本次研究发现的1例KRAS第4外显子K117N与BRAF第11外显子G466V位点同时突变患者,未见有既往文献报道。文献报道的9例KRAS与BRAF基因共同突变患者,5例患者选择了手术,这其中有2例先化疗再手术,1例先手术再化疗,2例单纯手术而不化疗,1例单纯化疗。有报道生存期的5例患者,结合本次研究报道的1例患者,转移性结直肠癌患者中KRAS与BRAF基因同时突变类型的平均生存时间为(259.00±76.80)d,中位生存期为(180.00±89.41)d,Kaplan-Meier生存曲线见图2。

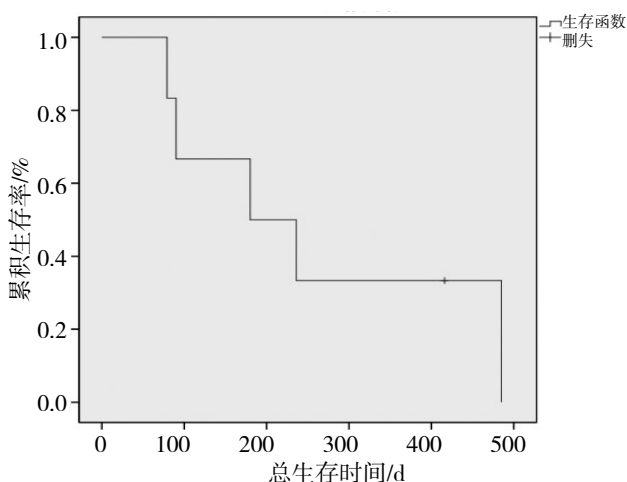


图2 KRAS与BRAF基因同时突变患者的Kaplan-Meier生存曲线

3 讨论

本次研究所报道的KRAS/NRAS/BRAF基因突变的数据与历史文献报道的数据大致相符。报道的数据主要来自转移性结直肠癌的患者,这与大宗文献报道时,部分文献并未区分I~III期与IV期结直肠癌患者的数据有所区别,并更为精确。本次研究入

组的转移性结直肠癌患者中以 KRAS 基因突变以及 KRAS/BRAF/NRAS 三者无突变的野生型患者为主, NRAS 基因与 BRAF 基因突变患者相对较少。KRAS 基因突变以第 2 外显子 G12D 位点突变为主, 而 BRAF 突变患者以第 15 外显子 V600E 位点突变为主。

本次研究结果发现, 转移性结直肠癌患者 KRAS 与 BRAF 基因突变在统计学上表现为互斥 ($P < 0.05$), 这与大量文献报道一致。但本次研究仍发现 1 例罕见的 KRAS 第 4 外显子 C351A>C/p.K117N 与 BRAF 第 11 外显子 C1397G>T/p.G466V 同时突变患者, 该同时性突变的类型在结直肠癌中未见有既往文献报道, 这可能跟肿瘤异质性有关。有文献报道, 单纯 KRAS 第 4 外显子 K117N 位点突变的概率为 0.45%, 而单纯 BRAF 第 11 外显子 G466V 位点突变的概率为 0.07%^[8]。据此推测, KRAS 第 4 外显子与 BRAF 第 11 外显子同时突变, 其发生率可能在 0.0003% 至 0.07% 之间。已有大综文献报道, KRAS 突变患者对西妥昔单抗及帕尼单抗耐药, 而维莫非尼对非 BRAF V600E 突变患者疗效不佳。体外研究表明, 在 BRAF V600E 突变 KRAS 野生型的甲状腺癌中, 长期使用维莫非尼治疗后, 部分细胞会被诱导自发产生 KRAS G12D 突变, 而使原来 BRAF V600E 突变细胞对维莫非尼治疗的敏感性降低^[9], 在结直肠癌中也有类似的患者报道。这说明 KRAS G12D 突变对后续的 BRAF 通路信号传导有不利影响, 并可能导致对维莫非尼的耐药。BRAF G466V 突变属于第 III 类 BRAF 突变, 在非小细胞肺癌中多见。与第 I 类及第 II 类 BRAF 突变为 RAS 非依赖突变不同, 第 III 类 BRAF 突变, 如 BRAF G466V/D594N 突变, 往往与 RAS 突变并存, 并依赖 RAS 的激活。第 III 类 BRAF 突变更像是一个放大器, 对 ERK 负反馈敏感, 反过来放大了 RAS 激活所产生的效应。这些突变所产生的对应激酶蛋白比野生型 BRAF 更强结合到 RAS-GTP 上, 导致 ERK 通路表达增加。目前临床文献在黑色素瘤中有报道, 带有这类 BRAF 突变的患者一般并发 RAS 突变或 NF1 缺失, 从而引发癌症。在结直肠癌中, BRAF G466V 等第 III 类 BRAF 突变且 RAS 野生型的患者对维莫非尼耐药, 但因为依赖 RAS 激活, 已有人源肿瘤组织来源的移植动物模型 (patient-derived xenografts, PDXs) 实验证明其对西妥昔单抗有效^[10]。当然这种有效是建立在第 III 类 BRAF 突

变需要依赖 RAS 激活的理论基础上。但当这类 BRAF 突变并发 RAS 突变时, RAS 持续激活, 将对西妥昔等 EGFR 单抗耐药。所以, 并发 KRAS K117N 与 BRAF G466V 突变的患者, 可能对西妥昔/帕尼单抗与维莫非尼, 单用或者联用均耐药。同时, 虽然机制不同, 但更为常见的类型, KRAS G12D 与 BRAF V600E 同时性突变患者, 也可能对西妥昔单抗、帕尼单抗及维莫非尼耐药。

回顾既往已报道的文献, 转移性结直肠癌中 KRAS 与 BRAF 基因同时突变类型患者的治疗方案至今没有定论。目前只能根据美国国立综合癌症网络/欧洲肿瘤医学学会指南指导, 结合多学科讨论, 做出对应的手术时机, 或者放化疗时机的选择。从本次研究所获得的患者资料来看, 单纯的化疗或者单纯的手术并不做首选推荐。大部分患者选择以手术为主结合化疗的治疗方式, 其总生存时间较单纯化疗/单纯手术也更长, 但是先化疗还是先手术, 没有定论。化疗方案的选择上, 如果患者身体可耐受的情况下, 一线可考虑三药化疗 (奥沙利铂+伊立替康+5 氟尿嘧啶)。靶向药物的选择, 由于 KRAS 突变对于西妥昔等 EGFR 单抗耐药, 可考虑选用贝伐单抗治疗。对于小部分 KRAS 并发 BRAF V600 突变的患者, 还可考虑维莫非尼治疗, 但如合并 KRAS G12D 等突变, 可能导致维莫非尼治疗效果不佳^[9]。后线治疗可考虑瑞格菲尼, MEK 抑制剂等。本次研究统计入组患者, 获得的平均生存时间为 (259.00±76.80)d, 中位生存期平均为 (180.00±89.41)d。而目前 BRAF 突变的结直肠癌患者, 平均生存时间已可达 312 d^[11]。这提示 KRAS 与 BRAF 基因同时突变这一类型患者的预后较单纯 BRAF 突变预后更差, 更好的临床治疗策略很可能可以改善这一现状。鉴于这一类型患者较为罕见, 需要收集更多的临床患者资料以供决策。

综上所述, 转移性结直肠癌患者中, KRAS 与 BRAF 基因突变表现为互斥, 但存在小概率的 KRAS 与 BRAF 基因同时突变的罕见病例。这一罕见突变类型的相关治疗策略尚无定论, 结合回顾既往病例报道的治疗经验, 应以手术为主, 结合化疗, 总体来说预后不佳。相对常见的 KRAS G12D 与 BRAF V600E 同时性突变类型可能对西妥昔单抗, 帕尼单抗及维莫非尼均耐药。

(下转第 697 页)

- cyte ratio and its relation with markers of inflammation and myocardial necrosis in patients with acute coronary syndrome[J].*Med Arch*,2017,71(5):312-315.
- 3 蒋奕,王惠临.中性粒细胞/淋巴细胞比值评估肿瘤预后价值的研究进展[J].*中国癌症防治杂志*,2016,8(5):329-332.
 - 4 Qin B, Ma N, Tang Q, et al. Neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) and platelet to lymphocyte ratio (PLR) were useful markers in assessment of inflammatory response and disease activity in SLE patients[J].*Mod Rheumatol*, 2016,26(3):372-376.
 - 5 吕常智.中性粒细胞与淋巴细胞比值比介入治疗后急性心肌梗死患者预后的影响[J].*中国现代医生*,2016,54(12):1-4.
 - 6 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组.慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2013年修订版)[S].*中华结核和呼吸杂志*,2013,36(4):255-264.
 - 7 慢性阻塞性肺疾病急性加重(AECOPD)诊治专家组.慢性阻塞性肺疾病急性加重(AECOPD)诊治中国专家共识(2017年修订版)[S].*国际呼吸杂志*,2017,37(14):1041-1057.
 - 8 顾宇彤.诊断慢性阻塞性肺疾病急性加重的生物标志物[J].*中华结核和呼吸志*,2014,37(4):247-249.
 - 9 Sethi S, Muscarella K, Evans N, et al. Airway inflammation and etiology of acute exacerbations of chronic bronchitis[J].*Chest*,2000,118(6):1557-1565.
 - 10 慢性阻塞性肺疾病急性加重(AECOPD)诊治专家组.《AECOPD诊治中国专家共识》座谈会——抗菌药物在AECOPD治疗中的应用[J].*国际呼吸杂志*,2013,5(33):326-329.
 - 11 Teng F, Ye H, Xue T. Predictive value of neutrophil to lymphocyte ratio in patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease[J].*PLoS One*,2018,13(9):e0204377.

(收稿日期 2020-01-10)

(本文编辑 蔡华波)

(上接第681页)

参考文献

- 1 Keum NN, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies[J].*Nat Rev Gastroenterol Hepatol*,2019,16(5):713-732.
- 2 Van Cutsem E, Kohne CH, Lang I, et al. Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: Updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status[J].*J Clin Oncol*,2011,29(15):2011-2019.
- 3 Halil SI, Kazmi SMA, Yorio JT, et al. Rare though not mutually exclusive: A report of three cases of concomitant KRAS and BRAF mutation and a review of the literature [J].*J Cancer*, 2013, 4(4):320-322.
- 4 Zhang J, Zheng J, Yang Y, et al. Molecular spectrum of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA mutations in Chinese colorectal cancer patients: Analysis of 1,110 cases[J].*Sci Rep*,2015,5:18678.
- 5 Anusha V, Akshay M, Anup KLK. Are all mutations the same? A rare case report of coexisting mutually exclusive KRAS and BRAF mutations in a patient with metastatic colon adenocarcinoma[J].*Case Reports*,2017,2017:2321052.
- 6 Larki P, Gharib E, Taleghani MY, et al. Coexistence of KRAS and BRAF mutations in colorectal cancer: A case report supporting the concept of tumoral heterogeneity[J].*Cell J*,2017,19(Suppl 1):113-117.
- 7 Deshwar A, Margonis GA, Andreatos N, et al. Double KRAS and BRAF mutations in surgically treated colorectal cancer liver metastases: An international, multi-institutional case series[J].*Anticancer Res*, 2018, 38(5):2891-2895.
- 8 AACR Project GENIE Consortium. AACR project GENIE: Powering precision medicine through an international consortium[J].*Cancer Discov*,2017,7(8):818-831.
- 9 Danysh BP, Rieger EY, Sinha DK, et al. Long-Term vemurafenib treatment drives inhibitor resistance through a spontaneous KRAS G12D mutation in a BRAF V600E papillary thyroid carcinoma model[J].*Oncotarget*, 2016, 7(21):30907-30923.
- 10 Yao Z, Yaeger R, Rodrik-Outmezguine VS, et al. Tumours with class 3 BRAF mutants are sensitive to the inhibition of activated RAS[J].*Nature*,2017,548(7666):234-238.
- 11 Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer[J].*Ann Oncol*, 2016, 27(8):1386-1422.

(收稿日期 2020-05-09)

(本文编辑 蔡华波)