

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2018.20180375

结直肠腺癌 BRAF 基因突变的检测及其临床意义

徐磊, 刘佳, 徐一凡, 沈立承, 江峥增, 王鑫, 宿杰·阿克苏, 徐晨, 侯英勇, 黄洁*

复旦大学附属中山医院病理科, 上海 200032

[摘要] **目的:**探讨结直肠腺癌 BRAF 基因突变的检测及临床意义。**方法:**采用 PCR 直接测序法检测结直肠腺癌患者石蜡包埋肿瘤组织中 BRAF 基因突变情况, 分析 BRAF 基因突变与患者性别、年龄、组织学分级及临床分期的相关性。**结果:**17 例 BRAF 基因突变结直肠腺癌病例中, 16 例为 15 外显子突变, 1 例为 11 外显子突变。16 例中, 突变位于 15 外显子第 600 位密码子 14 例, 包括第 1 799 位碱基 T 突变为 A (Val600Glu, V600E) 13 例 (92.9%), 第 1 799、1 800 位碱基 T、G 突变为 A、A (Val600Glu, V600E) 1 例; 突变位于 15 外显子第 594 位密码子 2 例, 均为第 1 780 位碱基 G 突变为 A (Asp594Asn, D594N)。1 例 11 外显子突变位于第 468 位密码子, 第 1 403 位碱基 G 突变为 C (Gly468Val, G468V)。BRAF 基因突变与患者性别、年龄无相关性; 组织学分级为Ⅲ级的 BRAF 基因突变患者数多于Ⅱ级 ($P=0.029$); 临床分期为Ⅳ期的 BRAF 基因突变患者数多于Ⅱ期、Ⅲ期 ($P=0.011$)。**结论:**BRAF 基因突变与结直肠腺癌组织学分级和临床分期相关, 随着组织学分级和临床分期的增加, BRAF 基因突变率升高。

[关键词] 结直肠腺癌; BRAF 基因突变; 聚合酶链式反应; 序列分析

[中图分类号] R 735.3 **[文献标志码]** A

Detection of BRAF gene mutation and its clinical significance in colorectal cancer

XU Lei, LIU Jia, XU Yi-fan, SHEN Li-cheng, JIANG Zheng-zeng, WANG Xin, SUJIE Akesu, XU Chen, HOU Ying-yong, HUANG Jie*

Department of Pathology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

[Abstract] **Objective:** To investigate the clinical significance of BRAF gene mutation detection in colorectal cancer. **Methods:** The BRAF gene mutations in paraffin embedded tumor tissues of colorectal cancer patients were detected by PCR direct sequencing, and the relationship between BRAF gene mutation and gender, age, histological grade, and clinical stage was analyzed. **Results:** In 17 cases of colorectal cancer with BRAF gene mutations, 16 cases had mutations in fifteenth exon and 1 case in eleventh exon. In 16 cases, mutations were mainly located in the 600th codon of the fifteenth exon in 14 cases, including 13 cases with the 1 799th base mutation of T to A (Val600Glu, V600E; accounting for 92.9% of the mutations in the 600th codon), and 1 case with the 1 799th and 1 800th base mutations of GT to AA (Val600Glu, V600E); 2 cases in the 594th codon of fifteenth exon with the 1 780th base G to A (Asp594Asn, D594N). The mutation of eleventh exon in 1 case was in the 468th codon with the mutation of the 1 403rd base G to C (Gly468Val, G468V). The status of BRAF gene mutations was not related to the sex and age of the patient. The number of BRAF gene mutation patients with histological grade Ⅲ was more than that of grade Ⅱ ($P=0.029$) and the number of BRAF gene mutations with clinical stage Ⅳ was more than those with stage Ⅱ and stage Ⅲ ($P=0.011$). **Conclusions:** BRAF gene mutations in colorectal cancers are associated with histological grade, clinical stage and worse prognosis. With the increase of histological grade and clinical stage, the mutation rate of BRAF gene increases.

[Key Words] colorectal cancer; BRAF gene mutation; polymerase chain reaction; sequence analysis

结直肠癌是常见的消化道恶性肿瘤之一, 最常见的病理类型为腺癌。以手术切除、化学药物治疗和放射治疗为主的综合治疗能有效提高结直肠癌患者的 5 年生存率^[1-3]。近年来, 结直肠癌的分子靶向治疗迅速发展, 分子靶向药物的联合应用明显延

长了晚期结直肠癌患者的生存时间^[4-6]。目前应用于结直肠癌的分子靶向药主要为以表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 为靶点的单克隆抗体, 如西妥昔单抗和帕尼单抗。研究^[4-8]发现, 发生鼠类肉瘤滤过性病毒致癌基因同源

[收稿日期] 2017-11-30 **[接受日期]** 2017-12-22

[作者简介] 徐磊, 技师. E-mail: eddie1117xl@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-64041990-3322; E-mail: huangjie1116@163.com

体 B1(BRAF)基因突变的患者均对 EGFR 单克隆抗体耐药。而 BRAF 基因是结直肠癌治疗的重要靶点。本研究回顾性分析了近年来本院收治的结直肠癌 BRAF 基因突变患者的 BRAF 基因检测及突变情况,并探讨了 BRAF 基因突变与临床病理的关系,进而探讨其临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择复旦大学附属中山医院病理科 2008 年 1 月至 2013 年 12 月接受 BRAF 基因检测且检测结果为阳性的结直肠癌患者 17 例。其中,男性 7 例,女性 10 例;年龄 28~74 岁,中位年龄 47 岁,平均年龄 48 岁。所有标本均为石蜡包埋标本,其中手术切除标本 15 例,活检标本 2 例;所有标本均经病理证实为结直肠腺癌。肿瘤组织学分级 2 级 4 例,3 级 13 例;临床分期为Ⅱ期 1 例,Ⅲ期 5 例,Ⅳ期 11 例。本研究经医院伦理委员会审核批准。

1.2 BRAF 基因测序及分析 结直肠癌组织石蜡包埋,按 5 μm 厚切片,贴在干净载玻片上,烤片,苏木精-伊红(H-E)染色,刮除非肿瘤组织和出血坏死较明显的区域,收集肿瘤组织,提取肿瘤组织基因组 DNA。

将提取的基因组 DNA 用 PCR 扩增法扩增 BRAF 基因 11、15 外显子。11 外显子引物序列为:5'-TTT TCT GTT TGG CTT GAC TTG A-3'(F),5'- TGT CAC AAT GTC ACC ACA TTA CA-3'(R);扩增片段为 192 bp。15 外显子引物序列为:5'- TGC TTG CTC TGA TAG GAA AAT G-3'(F),5'- AGC ATC TCA GGG CCA AAA AT-3'(R);扩增片段为 228 bp。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。反应体系为 50 μL:2×Taq PCR Master Mix 25 μL,上游引物 2 μL(50 pmol),下游引物 2 μL(50 pmol),模板 3~5 μL(1 mg/L),去离子水补足 50 μL。反应条件:94℃ 45 s,62℃ 45 s,72℃ 1 min,36 个循环;72℃ 延伸 10 min。

取 5 μL PCR 反应产物用 2%的琼脂糖凝胶电泳鉴定扩增结果,PCR 产物经纯化(纯化试剂盒,Axygen)及测序反应(BigDye v3.0 试剂盒,ABI)后,用 3730XL 型测序仪(ABI)测序。所有标本均经正向及反向测序。用 Chromas 软件分析测序图谱,与基因库 BRAF 基因序列对比。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 15.0 软件进行数据

分析。计数资料以 $n(\%)$ 表示,计量资料组间比较采用 χ^2 检验。检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 BRAF 基因突变 结果(图 1、表 1)显示:17 例 BRAF 基因突变结直肠癌病例中,16 例为 15 外显子突变,1 例为 11 外显子突变。突变主要位于 15 外显子第 600 位密码子,共 14 例(82.4%,14/17),占 15 外显子突变的 87.5%,包括第 1 799 位碱基 T 突变为 A(Val600Glu, V600E)13 例(92.9%,13/15),第 1 799、1 800 位碱基 T、G 突变为 A、A(Val600Glu, V600E)1 例。2 例突变位于 15 外显子第 594 位密码子(11.8%,2/17),第 1 780 位碱基 G 突变为 A(Asp594Asn, D594N)。1 例 11 外显子突变位于第 468 位密码子(5.9%,1/17),第 1 403 位碱基 G 突变为 C(Gly468Val, G468V)。

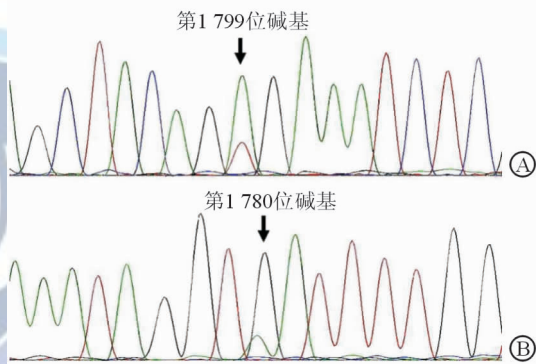


图 1 BRAF 基因 15 外显子突变

A:第 1 799 位碱基 T 突变为 A; B: 第 1 780 位碱基 G 突变为 A

表 1 患者临床病理特征及 BRAF 基因突变类型

No.	性别	年龄/岁	组织学分级	临床分期	BRAF 基因突变类型
1	女	41	2	Ⅳ	GTG>GAA(V600E)
2	男	47	3	Ⅳ	GAT>AAT(D594N)
3	女	28	2	Ⅳ	GTG>GAG(V600E)
4	男	41	3	Ⅲ	GTG>GAG(V600E)
5	男	30	3	Ⅲ	GTG>GAG(V600E)
6	男	61	3	Ⅳ	GGA>GCA(G468V)
7	女	74	3	Ⅲ	GTG>GAG(V600E)
8	男	41	2	Ⅳ	GTG>GAG(V600E)
9	女	51	3	Ⅲ	GTG>GAG(V600E)
10	女	42	3	Ⅳ	GTG>GAG(V600E)
11	女	47	3	Ⅳ	GTG>GAG(V600E)
12	女	55	3	Ⅳ	GTG>GAG(V600E)
13	女	55	3	Ⅳ	GTG>GAG(V600E)
14	女	60	3	Ⅳ	GTG>GAG(V600E)
15	男	43	3	Ⅳ	GTG>GAG(V600E)
16	女	51	2	Ⅱ	GAT>AAT(D594N)
17	男	67	3	Ⅲ	GTG>GAG(V600E)

2.2 BRAF 基因突变与临床病理指标的相关性 结果(表 2)显示:BRAF 基因突变与患者性别、年龄无相关性。组织学分级为 3 级的 BRAF 基因突变患者数多于 2 级,差异有统计学意义($P=0.029$);临床分期为Ⅳ期的 BRAF 基因突变患者数多于Ⅱ期、Ⅲ期,差异有统计学意义($P=0.011$)。

表 2 BRAF 基因突变与患者临床病理特征的相关性
N=17

指 标	n	χ^2 值	P 值
性别		0.529	0.467
男	7		
女	10		
年龄		0.059	0.808
<50 岁	9		
≥50 岁	8		
组织学分级		4.765	0.029
2	4		
3	13		
临床分期		8.941	0.011
Ⅱ	1		
Ⅲ	5		
Ⅳ	11		

3 讨 论

BRAF 基因位于人类染色体 7q34,长度约为 190 kb,其编码区可编码相对分子量为 67 000~99 000 的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。该酶是 Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路中重要的转导因子,通过与细胞表面受体结合,将信号传递至细胞核内后,激活细胞周期蛋白 D₁ (cyclin D₁)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、禽类髓细胞病毒 MC-29 的 V-myc 细胞同源序列(c-myc)等因子,参与调控细胞内的多种生物学事件;而当 Ras/Raf/MEK/ERK 通路被异常激活时,可导致肿瘤的发生^[9-11]。

研究^[9,12-13]表明,BRAF 基因与 K-RAS 基因虽然同参与 Ras/Raf/MAPK 通路,但两者突变具有相互排他性,BRAF 基因能不依赖于 K-RAS 基因而独立参与肿瘤的发生发展过程。研究^[14]显示,黑色素瘤和结肠癌患者中 BRAF 基因突变率分别为 66%、15%。该研究显示,主要有 2 种突变类型,约 89% 的突变位于 15 位外显子,其中约 92% 发生于第 1 799 位碱基(T 突变为 A),导致其所在的第

600 位密码子编码的谷氨酸被缬氨酸取代(V600E);约 10% 的突变位于 11 位外显子,发生如 G463、G465、G468 等位点突变。本研究 17 例 BRAF 基因突变的结直肠癌患者中,BRAF 基因突变主要位于 15 外显子第 600 位密码子(V600E, 82.4%),其中第 1 799 位碱基突变(T 突变为 A)占 92.9%;此外,还有 2 例 15 外显子第 594 位密码子突变(D594N)和 1 例 11 外显子第 468 密码子突变(G468V),与文献^[14]报道相符。

本研究未发现结直肠癌中 BRAF 基因突变与患者性别、年龄的相关性,与其他研究结论^[15-16]一致。本研究中,随着组织学分级的增加,BRAF 基因突变患者人数增加,且差异有统计学意义($P<0.05$),与 Yuen 等^[16]的研究结论相符。结果提示 BRAF 基因可作为结直肠癌诊断、治疗的指标。本研究还发现,临床分期中Ⅳ期 BRAF 基因突变患者人数比Ⅱ期、Ⅲ期多($P<0.05$),可能与 BRAF 基因突变激活丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,导致下游信号通路 MEK/ERK 激活有关。动物实验^[17]表明,采用特异性 MEK 激酶抑制剂阻断该通路,可抑制黑色素瘤的肺转移,甚至能使已经产生的肺转移灶缩小、消失。ERK 活性增加除影响多种恶性肿瘤相关基因表达外,还影响肌球蛋白轻链激酶(MLCK)的活性,降低 E-钙黏素表达和增加基质金属蛋白酶(MMP)分泌^[18],导致肿瘤细胞增殖和侵袭能力升高。

越来越多的研究^[19-22]发现,BRAF 突变预示转移性结直肠癌(mCRC)的患者预后较差。Samowitz 等^[22]认为,BRAF 基因 V600E 突变是结肠癌患者总生存时间(OS)强有力的预后因子,在微卫星不稳定性(MSI)低或稳定的肿瘤患者中更是如此。研究^[22]也表明,BRAF 基因 V600E 突变提示结肠癌患者预后不良,而且其预测作用与临床分期和治疗方式无关。该研究对 100 余例接受手术治疗的Ⅱ期结肠癌患者和 200 余例接受 5-氟尿嘧啶辅助化学治疗的Ⅲ期结肠癌患者进行的生存分析结果表明,BRAF 基因 V600E 突变是结肠癌患者总生存时间和癌症特异性生存时间的独立预测因素。因此,BRAF 基因可能为结肠癌的不良预后预测因子。

近年来,使用靶向药物治疗结直肠癌已改善了患者的预后和生存质量。然而,Roock 等^[23]的研究表明,西妥昔单抗联合化疗对 BRAF 突变患者的有效率明显低于野生型者(8.3% vs 38.0%, $P=$

0.001 2);而 PRIME 研究显示,BRAF 基因突变患者不能从帕尼单抗治疗中获益^[24]。因此,在对结直肠癌患者进行 EGFR 单克隆抗体治疗前,应进行 BRAF 基因检测。

目前,以 BRAF 信号通路上的关键分子为靶点的抑制剂在黑素瘤患者中取得了良好的疗效。2011 年,首个针对 BRAF 基因 V600E 突变的抑制剂威罗菲尼(vemurafenib, PLX4032)获美国食品药品监督管理局(FDA)批准上市,用于治疗 BRAF 基因 V600E 突变的黑素瘤患者。2015 年,小分子 MEK 抑制剂考比替尼(cobimetinib)获 FDA 批准,该药可联合威罗菲尼用于 BRAF V600E 或 V600K 突变阳性、不可切除性或转移性黑素瘤患者的治疗。与威罗菲尼+安慰剂组相比,考比替尼与威罗菲尼联合治疗组疾病恶化或死亡风险显著降低,中位无进展生存期(9.9 个月 vs 6.2 个月, $P<0.001$)显著延长^[25]。然而,在结直肠癌领域,目前有关 BRAF 基因的研究还没有临床获益^[26],说明肿瘤信号转导通路还有待深入研究。

综上所述,BRAF 基因突变与结直肠腺瘤患者临床病理特征相关,可能是一项潜在的预后指标。结直肠癌患者 BRAF 基因突变情况及 EGFR 靶向治疗仍须进一步的研究,以进一步阐述结直肠癌发生发展的分子机制,并为寻找新的治疗靶点和药物提供理论依据。

参考文献

- [1] SIEGEL R, DESANTIS C, VIRGO K, et al. Cancer treatment and survivorship statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(4):220-241.
- [2] FISCHER J, HELLMICH G, JACKISCH T, et al. Outcome for stage II and III rectal and colon cancer equally good after treatment improvement over three decades [J]. Int J Colorectal Dis, 2015, 30(6):797-806.
- [3] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132.
- [4] SHINOZAKI E, YOSHINO T, YAMAZAKI K, et al. Clinical significance of BRAF non-V600E mutations on the therapeutic effects of anti-EGFR monoclonal antibody treatment in patients with pretreated metastatic colorectal cancer: the biomarker research for anti-EGFR monoclonal antibodies by comprehensive cancer genomics (BREAC) study[J]. Br J Cancer, 2017, 117(10):1450-1458.
- [5] KAJITANI T, MAKIYAMA A, ARITA S, et al. Anti-epidermal growth factor receptor antibody readministration in chemorefractory metastatic colorectal cancer[J]. Anticancer Res, 2017, 37(11):6459-6468.
- [6] QIU T, CHEN W, LI P, et al. Subsequent anti-VEGF therapy after first-line anti-EGFR therapy improved overall survival of patients with metastatic colorectal cancer [J]. Onco Targets Ther, 2018, 11:465-471.
- [7] MORONI M, VERONESE S, BENVENUTI S, et al. Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study [J]. Lancet Oncol, 2005, 6(5): 279-286.
- [8] SCHRAG D. The price tag on progress—chemotherapy for colorectal cancer[J]. N Engl J Med, 2004, 351(4):317-319.
- [9] SOLIT D B, GARRAWAY L A, PRATILAS C A, et al. BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition[J]. Nature, 2006, 439(7074):358-362.
- [10] HATZIVASSILIOU G, SONG K, YEN I, et al. RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth[J]. Nature, 2010, 464(7287): 431-435.
- [11] TOL J, NAGTEGAAL I D, PUNT C J. BRAF mutation in metastatic colorectal cancer[J]. N Engl J Med, 2009, 361(1):98-99.
- [12] GATTENLÖHNER S, ETSCHMANN B, KUNZMANN V, et al. Concordance of KRAS/BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer before and after anti-egfr therapy [J]. J Oncol, 2009, 2009(3-4):831626.
- [13] YAEGER R, SALTZ L. BRAF mutations in colorectal cancer: clinical relevance and role in targeted therapy[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2012, 10(11):1456-1458.
- [14] CAPPER D, PREUSSER M, HABEL A, et al. Assessment of BRAF V600E mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody [J]. Acta Neuropathol, 2011, 122(1):11-19.
- [15] WAN P T, GARNETT M J, ROE S M, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF[J]. Cell, 2004, 116(6):855-867.
- [16] YUEN S T, DAVIES H, CHAN T L, et al. Similarity of the phenotypic patterns associated with BRAF and KRAS mutations in colorectal neoplasia[J]. Cancer Res, 2002, 62(22):6451-6455.
- [17] COLLISSE E A, DE A, SUZUKI H, et al. Treatment of metastatic melanoma with an orally available inhibitor of the Ras/Raf/MAPK cascade[J]. Cancer Res, 2003, 63(18): 5669-5673.
- [18] ARKENAU H T, KEFFORD R, LONG G V. Targeting BRAF for patients with melanoma[J]. Br J Cancer, 2011, 104(3): 392-398.
- [19] DAVIES H, BIGNELL G R, COX C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer[J]. Nature, 2002, 417(6892): 949-954.
- [20] 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.
- [21] CREMOLINI C, PIETRANTONIO F, TOMASELLO G, et al. Vinorelbine in BRAF V600E mutated metastatic colorectal cancer: a prospective multicenter phase II clinical study[J]. *ESMO Open*, 2017, 2(3): e000241.
- [22] SAMOWITZ W S, SWEENEY C, HERRICK J, et al. Poor survival associated with the BRAF V600E mutation in microsatellite-stable colon cancers[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(14):6063-6069.
- [23] DE ROOCK W, CLAES B, BERNASCONI D, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis [J]. *Lancet Oncol*, 2010, 11(8): 753-762.
- [24] PEETERS M, OLINER K S, PRICE T J, et al. Analysis of KRAS/NRAS mutations in a phase III study of panitumumab with FOLFIRI compared with FOLFIRI alone as second-line treatment for metastatic colorectal cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2015, 21(24):5469-5479.
- [25] LARKIN J, ASCIERTO P A, DRÉNO B, et al. Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma [J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(20):1867-1876.
- [26] HONG D S, MORRIS V K, EL OSTA B, et al. Phase I B study of vemurafenib in combination with irinotecan and cetuximab in patients with metastatic colorectal cancer with BRAF V600E mutation[J]. *Cancer Discov*, 2016, 6(12): 1352-1365.

[本文编辑] 姬静芳

