

# 结直肠癌分子生物标志物检测专家共识

《结直肠癌分子生物标志物检测专家共识》编写组

## 一、分子生物标志物检测的临床意义

结直肠癌是常见的消化道肿瘤之一,我国的结直肠癌发病率和病死率都居于前列。多数结直肠癌患者在初诊时已属于中晚期,正确的治疗决定患者的预后,结直肠癌疗效预测和预后评估分子标志物的检测结果对临床制订正确的治疗方案非常重要。随着靶向治疗和免疫治疗在结直肠癌治疗中的应用,晚期结直肠癌的治疗进入了一个新的阶段。

多项临床研究表明,RAS(包括 KRAS 及 NRAS)野生型的晚期结直肠癌患者能从抗表皮生长因子受体(EGFR)单克隆抗体治疗中明确获益,患者的总生存时间显著延长<sup>[1-3]</sup>,尤其左半结直肠癌患者,化疗联合抗 EGFR 治疗,患者的中位总生存期可达到 55 个月以上。已有研究证明,Ⅲ~Ⅳ期患者如存在 RAS 突变预后不良<sup>[4]</sup>;KRAS 野生型患者对术前化疗的反应比突变型者好,总生存期和无病生存期均延长;KRAS 野生型患者术后用非甾体类抗炎药可以获益,患者总生存期延长,突变的患者则没有这种效应。

BRAF V600E 突变的转移性结直肠癌预后差<sup>[4]</sup>,但目前缺乏足够证据支持 BRAF V600E 突变作为抗 EGFR 抗体治疗疗效预测的分子标志物。

错配修复(MMR)功能缺陷和高频微卫星不稳定性(MSI-H)对结直肠癌患者的预后判断、药物疗效预测和 Lynch 综合征筛查有明确的指导意义<sup>[4-6]</sup>。Ⅱ期结直肠癌患者如是 MSI-H 提示预后较好,但可能无法从氟尿嘧啶类单药辅助治疗中获益<sup>[7]</sup>;MMR 功能缺陷或 MSI-H 的患者提示 Lynch 综合征的可能;程序性死亡分子 1(PD-1)抗体用于 MMR 功能缺陷或 MSI-H 的晚期实体肿瘤的治疗有效<sup>[8]</sup>。

Lynch 综合征的筛查对患者及其家属都非常重要,有助于临床医师制订随访计划及手术治疗方案,并进行早期干预<sup>[9]</sup>。Lynch 综合征筛查基本策略请参考《中国临床肿瘤学会(CSCO)结直肠癌诊疗指南 2017 版》<sup>[9]</sup>。Lynch 综合征患者的肿瘤表现为 MSI-H。10%~15%的散发性结直肠癌也存在肿瘤组织 MLH1 蛋白的缺失,表现为 MSI-H。BRAF V600E 突变的存在与否可以初步确定是 Lynch 综合征还是散发性结直肠癌。如果突变存在提示为散发性结直肠癌,无 BRAF V600E 突变时提示 Lynch 综合征可能。

目前国内结直肠癌分子生物标志物检测方法多样,需要规范检测,为临床治疗提供可靠的依据。

## 二、分子生物标志物检测的原则

1.适用人群:推荐对临床确诊为复发或转移性结直肠癌患者进行 RAS 和 BRAF 基因突变检测。RAS 基因突变分析应包括 KRAS 和 NRAS 中第 2 号外显子的第 12、13 位密码子,第 3 号外显子的第 59、61 位密码子,以及第 4 号外显子的第 117 和 146 位密码子<sup>[10-11]</sup>。BRAF V600E 突变状态的评估应在 RAS 检测时同步进行,以对预后进行分层,指导临床治疗<sup>[6,10-11]</sup>。可考虑对所有结直肠癌患者进行 MMR 或 MSI 检测,用于 Lynch 综合征筛查、预后分层及指导免疫治疗。MLH1 缺失的 MMR 缺陷型肿瘤应进行 BRAF V600E 突变分析,以评估发生 Lynch 综合征的风险(存在 BRAF V600E 突变强烈提示散发性肿瘤,不存在 BRAF V600E 突变时无法排除发生 Lynch 综合征的风险)。

### 2.标本类型和处理:

(1)常见的标本类型包括肠镜活检标本和手术切除标本;有胸腹水的病例可以获得脱落细胞样本,分子检测时,制成细胞蜡块的样本优于涂片样本;液体活检时用血液标本。

(2)新鲜标本离体后,在尽可能短的时间内提取 DNA 贮存备用。石蜡包埋组织标本按下述要求处理:标本离体时间建议控制在 30 min 内,所有标本离体后及时进行标记、切开、固定等处理。应用新

DOI:10.3760/ema.j.issn.0529-5807.2018.04.002

执笔人:吴焕文(中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院病理科);邵建永(中山大学附属肿瘤医院分子诊断科)

通信作者:来茂德(310058 浙江大学医学院病理学系,E-mail: lmp@zju.edu.cn);丁彦青(510515 南方医科大学南方医院病理科,E-mail:dyq@fimmu.com);梁智勇(100730 中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院病理科,E-mail: liangzhiyong1220@yahoo.com)

鲜配制的 3.7% 中性缓冲甲醛液固定标本,避免使用含重金属离子的固定液。固定液的量应至少为组织体积的 4~10 倍。活检标本固定 6~12 h,手术标本固定 6~48 h。固定温度以正常室温为宜。蜡块保存温度在 32 ℃ 以下。

(3) 血液标本收集及处理。应严格遵照血液标本采集、运输及储存的标准流程与规范,防止白细胞的裂解及游离 DNA 的降解。

(4) 脱落细胞标本沉渣包埋并经病理医师评估肿瘤细胞比率达到检测要求后,进行 DNA 提取及后续分子检测。另外,具有较高肿瘤细胞含量的胸腹水,可离心取细胞沉淀,直接进行 DNA 提取,获得的 DNA 质量高,有利于后续分子检测。

(5) 如果同时有手术切除标本和肠镜活检标本,建议用手术切除标本进行分子检测。仅有肠镜标本的就用该标本。在获取样本前,要有病理医师诊断评估,肿瘤细胞比例宜大于 50%。小活检标本最好含有 200 个以上的肿瘤细胞。对于胸腹水脱落细胞学样本,至少需要 50 mL 以上的胸腹水,且含有 200 个以上的肿瘤细胞。

(6) 有多原发灶肿瘤应同时检测。患者有原发灶及转移灶时,也应同时检测。患者治疗后出现复发和/或转移,治疗针对复发和/或转移时,应对复发灶或转移灶进行检测。

(7) 迄今的研究表明,应用组织标本检测 RAS 突变状态与血液循环肿瘤 DNA (ctDNA) 的检测结果并不一致,所以没有数据支持血液检测可替代组织标本检测。血液检测针对 EGFR 疗效监测有潜在的应用价值。

3. 分子检测实验室的基本要求可参照《分子病理诊断实验室建设指南(试行)》<sup>[12]</sup>。

4. 分子病理检测的送检标本应在标本接收之日起 7 个工作日内给出最终检测结果。

### 三、检测流程规范

1. 样本选取:所有标本进行基因突变检测前均需要先进行常规病理检查和诊断,必须经病理诊断医师确定,肿瘤细胞获取的部位是没有明显的坏死、黏液和炎性病变的组织,保证有足够的细胞用于检测。建议用手工刮取或显微切割法获得较纯的肿瘤细胞。不同方法学检测的敏感性不一,所需的肿瘤细胞数不同,目前暂无统一标准。检测过程注意避免样本交叉污染。

2. DNA 提取方法:DNA 的提取必须使用符合标准的 DNA 提取试剂盒。当组织样本较少时,推荐使用简单的吸附柱提取法;当组织比较多时,可以采用针对甲醛固定石蜡包埋组织的 DNA 提取法。血液样本 ctDNA 的提取推荐使用血液专用 ctDNA 提取试剂盒。

3. 检测技术:根据不同的分子生物标志物,选择适合的检测方法。目前针对以下基因突变 (KRAS、NRAS、BRAF) 的检测方法主要包括两大类,第一类是测序为基础的方法,包括 Sanger 测序法、焦磷酸测序法 (Pyrosequencing) 和二代测序法 (NGS) 等;另一类是以 PCR 为基础的方法,包括荧光定量 PCR 法 (real-time PCR)、高压液相色谱分析法 (HPLC)、高分辨率熔解曲线法 (HRM)、数字 PCR 法 (dPCR) 等。MMR 状态的检测方法包括免疫组织化学 (IHC) 方法 (检测 4 个 MMR 蛋白的表达) 和 PCR 方法,两种方法检测具有高度的一致性,目前敏感性最高的方法是 PCR 检测方法,约 10% MMR 功能缺陷结直肠癌患者的 IHC 检测结果显示蛋白表达正常。IHC 的评价和意义见表 1。PCR 检测方法一般按 National Cancer Institute (NCI) 工作组推荐的 5 个位点 (BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250) 进行检测,5 个位点中有 2 个或 2 个以上有不稳定性,就定义为 MSI-H,1 个位点不稳定性

表 1 MMR 免疫组织化学染色结果分析

微卫星不稳定性表型	免疫组织化学结果 <sup>a</sup>				临床解读	机制 <sup>b</sup>
	MLH1	PMS2	MSH2	MSH6		
MSS 或 MSI-L	+	+	+	+	散发性	
MSI-H	-	-	+	+	散发性或 Lynch 综合征	MLH1 启动子甲基化/BRAF V600E 突变或 MLH1 胚系突变
MSI-H	+	+	-	-	Lynch 综合征	MSH2 胚系突变
MSI-H	+	+	+	-	Lynch 综合征	MSH6 胚系突变
MSI-H	+	-	+	+	Lynch 综合征	PMS2 胚系突变

注:<sup>a</sup> 免疫组织化学阳性表达均定位于细胞核,若因 MLH1 或 MSH2 突变导致 MLH1 或 MSH2 的表达丢失,他们相应的异二聚体 PMS2 或 MSH6 也会出现表达丢失,相反,如因 PMS2 或 MSH6 失活而出现 PMS2 或 MSH6 的表达丢失,则 MLH1 或 MSH2 的表达不受影响;<sup>b</sup> 部分 MMR 蛋白表达缺失和/或 MSI 病例可能由 MMR 体细胞突变等因素导致

为 MSI-L, 没有位点改变就定义为微卫星稳定 (MSS)。

4. 检测结果评估: 病理科医师必须综合评估候选样本的组织质量、数量, 肿瘤细胞比例等信息, 确保样本可用于生物标志物检测。目前基因检测方法众多, 方法学越来越灵敏, 高灵敏度检测方法下的基因突变检测结果的临床获益结论有待进一步研究。基于国际指南的推荐, 结合目前已有的大型临床研究的证据<sup>[13-17]</sup>, 推荐以 5% 作为组织学的 RAS 基因检测的突变丰度截断值 (cut-off 值)。血液学标本的检测应重新进行方法学验证, 建立相应的突变截断值。

5. 其他基因突变的检测、全基因组、全外显子组和全转录子组分析仅用于研究范畴<sup>[10-11, 18]</sup>。

#### 四、报告规范

1. 样本信息: 报告应包括患者基本信息、病理诊断、检测目的、送检日期、标本类型、标本描述、病理号 (如有多个蜡块, 应写明具体蜡块号) 及占有细胞数的百分比。MSI 检测除肿瘤组织外, 需另注明使用的对照组织来源 (如正常黏膜、无肿瘤细胞的淋巴结或是外周血白细胞)。用于 cDNA 检测的血液样本应注明样本量、标本采集时间及离心时间间隔、使用的血浆抗凝剂、有无溶血等。

2. 检测项目及方法: 报告需标明 DNA 提取方法及突变检测方法, 提取 DNA 的浓度和纯度, 分子生物标志物检测范围及位点, 检测方法的判读标准、灵敏性及局限性。错配修复基因蛋白表达报告内容要包括错配修复基因的名称、阴性或阳性 (在内对照细胞阳性的前提下, 肿瘤细胞核任何强度与范围的阳性均应判断为阳性)、抗体厂家及克隆号、判读标准。

3. 结果解读: (1) 未检测到相关基因目标位点突变, 具体写明检测的位点。(2) 检测到相关基因突变, 详细报告突变位点和密码子类型。检测结果描述应遵循人类基因组变异学会 (Human Genome Variation Society) 建议的规则给出核苷酸及氨基酸序列变化 (如报告 KRAS c. 35G>T, p. G12V)。(3) 原则上不建议分子病理检测报告对于检测结果的临床用药指导给予诠释, 避免给临床治疗带来潜在的不良影响。

4. 诊断报告: 检测分析报告附阴性或阳性结果图, 应注明报告日期, 有效诊断报告需由操作技术员

和报告医师在报告单上共同签字。应在报告单写明实验室联系方式, 以便临床医师或患者咨询。

编写组成员 (按单位名称汉语拼音字母顺序排列): 北京大学医学部病理学系 (张波); 北京医院病理科 (王征); 成都军区昆明总医院病理科 (杨举伦); 福建省肿瘤医院病理科 (陈刚); 复旦大学附属妇产科医院病理科 (赵晨燕); 复旦大学附属中山医院病理科 (侯英勇); 复旦大学附属肿瘤医院病理科 (周晓燕); 复旦大学医学院病理学系 (朱虹光); 广东省人民医院病理医学部 (刘艳辉); 广西医科大学第一附属医院病理科 (陈罡); 哈尔滨医科大学附属第一医院病理科 (吴鹤); 哈尔滨医科大学附属肿瘤医院病理科 (孟宏学); 海军军医大学附属长海医院病理科 (郑建明); 海南医学院第一附属医院病理科 (郑晶); 河南省人民医院病理科 (徐紫光); 河南省肿瘤医院病理科 (马杰); 河北医科大学第二医院病理科 (李月红); 河北医科大学第四医院病理科 (刘月平); 湖北省肿瘤医院病理科 (岳君秋); 华中科技大学同济医学院病理科 (段亚琦); 吉林大学第二医院病理科 (孙平丽); 吉林大学第一医院病理科 (段秀梅); 江苏省肿瘤医院肿瘤内科 (冯继锋); 解放军南京总医院病理科 (饶秋、周晓军); 解放军三〇七医院肿瘤学研究室 (刘毅); 解放军总医院病理科 (石怀银); 空军军医大学西京医院病理科 (王哲、叶菁); 陆军军医大学大坪医院病理科 (肖华亮); 陆军军医大学西南医院病理科 (阎晓初); 南方医科大学南方医院病理科 (丁彦青、梁莉); 南京医科大学第一附属医院病理科 (张智弘); 山东省肿瘤医院病理科 (穆殿斌); 山西省肿瘤医院病理科 (郗彦凤); 陕西省肿瘤医院病理科 (袁勇); 上海交通大学附属胸科医院病理科 (张杰); 上海交通大学医学院附属新华医院病理科 (王立峰); 上海市肺科医院病理科 (武春燕); 首都医科大学北京朝阳医院病理科 (路军); 首都医科大学宣武医院病理科 (滕梁红); 四川大学华西医院病理研究室/病理科 (刘卫平、唐源、叶丰); 苏州大学附属第一医院病理科 (郭凌川); 天津医科大学病理学教研室 (张丹芳); 西安交通大学附属第一医院病理科 (张冠军); 新疆医科大学第一附属医院病理科 (崔文丽); 徐州医科大学附属医院病理科 (刘慧); 浙江大学医学院病理学系 (来茂德、毛峥嵘); 浙江大学医学院附属第一医院病理科 (丁伟); 浙江大学医学院附属邵逸夫医院病理科 (许颂霄); 浙江省肿瘤医院病理科 (孙文勇); 郑州大学第一附属医院病理科 (姜国忠); 中国医科大学附属第一医院病理科 (邱雪杉、王亮); 中国医学科学院北京协和医学院北京协和医院病理科 (梁智勇、吴焕文); 中国医学科学院肿瘤医院病理科 (应建明); 中南大学医学院湘雅医院病理科 (周建华); 中山大学附属第一医院病理科 (王连唐); 中山大学附属肿瘤医院分子诊断科 (邵建永); 中山大学附属肿瘤医院肿瘤内科 (王风华、徐瑞华)



					检测编号
姓名:	性别:	年龄:	医院:	科室:	送检医师:
门诊号/住院号:		病理号:		临床诊断:	病理诊断:
检测方法:			检测仪器:		标本类型:
检测项目:RAS 及 BRAF 基因突变检测					
病理质控:石蜡包埋/活检标本,HE 染色组织学诊断为_____肿瘤细胞比例约为_____					
DNA 质量评估:浓度____g/mL,A260/A280=____,符合检测标准					
检测结果:					
KRAS 基因第 2 号外显子第 12 位密码子错义突变;c. 35G>T(p. G12V)					
检测结果诠释:					
本检测覆盖 KRAS,NRAS 基因第 2,3,4 号外显子第 12,13,59,61,117,146 位密码子的突变位点以及 BRAF V600E 突变。					
检测结果详细临床意义请咨询接诊临床医师					
检测技术员:			送检日期:		
报告医师:			报告日期:		
联系方式:			地址:		
备注:检测结果只对该检测标本负责,仅供临床医师参考					

参 考 文 献

[1] Stintzing S, Modest DP, Rossius L, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab for metastatic colorectal cancer ( FIRE-3 ): a post-hoc analysis of tumour dynamics in the final RAS wild-type subgroup of this randomised open-label phase 3 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2016,17(10):1426-1434. DOI: 10.1016/S1470-2045(16)30269-8.

[2] Venook AP, Niedzwiecki D, Lenz HJ, et al. Effect of first-line chemotherapy combined with Cetuximab or Bevacizumab on overall survival in patients with KRAS wild-type advanced or metastatic colorectal cancer: a randomized clinical trial[J]. *JAMA*, 2017, 317(23):2392-2401. DOI: 10.1001/jama.2017.7105.

[3] 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.

[4] Jessup JM, Goldberg RM, Aware EA, et al. Colon and rectum [M]// Armin MB, Greene FJ, Byrd DR, et al. *AJCC cancer staging manual*. 8th ed. New York: Springer, 2017;251-274.

[5] Bokemeyer C, Van Cutsem E, Rougier P, et al. Addition of cetuximab to chemotherapy as first-line treatment for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: pooled analysis of the CRYSTAL and OPUS randomised clinical trials[J]. *Eur J Cancer*, 2012,48(10):1466-1475. DOI: 10.1016/j.ejca.2012.02.057.

[6] NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guideline) for colon cancer version 2.2016[EB/OL][2015-11-24]. [www.nccn.org/patients/](http://www.nccn.org/patients/). [2017-07-29].

[7] Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(20):3219-3226. DOI: 10.1200/JCO.2009.27.1825.

[8] Le DT, Uram JN, Wang H, et al. PD-1 blockade in tumors with mismatch-repair deficiency[J]. *N Engl J Med*, 2015,372(26): 2509-2520. DOI: 10.1056/NEJMoa1500596.

[9] 李进,张苏展,蔡三军. 中国临床肿瘤学会指南工作委员会. 中国临床肿瘤学会(CSCO)结直肠癌诊疗指南 2017.V1 版[B]. 北京:人民卫生出版社, 2017.

[10] 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. DOI: 10.1093/annonc/mdw235.

[11] Sepulveda AR, Hamilton SR, Allegra CJ, et al. Molecular biomarkers for the evaluation of colorectal cancer: guideline from the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and the American Society of Clinical Oncology[J]. *J Clin Oncol*, 2017,35(13):1453-1486. DOI: 10.1200/JCO.2016.71.9807.

[12] 中华医学会病理学分会,中国医师协会病理科医师分会,中国抗癌协会肿瘤病理专业委员会,等. 分子病理诊断实验室建设指南(试行)[J]. *中华病理学杂志*, 2015, 44(6): 369-371. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0529-5807.2015.06.001.

[13] Qin S, Xu J, Wang L, et al. LBA-05 First-line FOLFOX-4 ± cetuximab in patients with RAS wild-type (wt) metastatic colorectal cancer (mCRC): the open-label, randomized phase 3 TAILOR trial [J]. *Ann Oncol*, 2016;ii141.

[14] Venook AP, Niedzwiecki D, Lenz HJ, et al. CALGB/SWOG 80405: phase III trial of irinotecan/5-FU/leucovorin (FOLFIRI) or oxaliplatin/5-FU/leucovorin (mFOLFOX6) with bevacizumab (BV) or cetuximab (CET) for patients (pts) with KRAS wild-type (wt) untreated metastatic adenocarcinoma of the colon or rectum (MCRC). *J Clin Oncol*, 2014, 32: 15 suppl, LBA3-LBA3.

[15] Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, et al. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2009,27(5):663-671. DOI: 10.1200/JCO.2008.20.8397.

[16] Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer [J]. *N Engl J Med*, 2009,360(14):1408-1417. DOI: 10.1056/NEJMoa0805019.

[17] Modest DP, Stintzing S, von WLF, et al. Impact of subsequent therapies on outcome of the FIRE-3/AIO KRK0306 trial: first-line therapy with FOLFIRI plus Cetuximab or Bevacizumab in patients with KRAS wild-type tumors in metastatic colorectal cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(32): 3718-3726. DOI: 10.1200/JCO.2015.61.2887.

[18] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会医政医管局,中华医学会肿瘤学分会. 中国结直肠癌诊疗规范(2015 版)[J]. *中华消化外科杂志*, 2015,14(10):783-799. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2015.10.001.

(收稿日期:2017-12-18)  
(本文编辑:常秀青)