

BRAF 基因突变对结直肠癌诊治的影响

朱丹¹, 陈大智²

1. 中日友好医院干部医疗科, 北京 100029; 2. 北京医院放射治疗科, 北京 100005

摘要: 结直肠癌(CRC)是临床常见的恶性肿瘤,其发病率、死亡率在国内外均处于前列,极大的威胁人们的生命健康。BRAF 基因编码 B-Raf 蛋白,在 Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路中起到重要的转导作用。BRAF 基因突变 90% 以上为 BRAF V600E,可引起 MAPK 通路异常活化,促进多种肿瘤的发生。BRAF 突变的检测对 CRC 的诊治起到重要作用,可辅助 CRC 的鉴别诊断、有效简化林奇综合征的筛查流程,预测疾病特点和预后(提示生存期缩短),指导治疗方案的选择(联合靶向治疗可能的获益更大)。

关键词: 结直肠癌; BRAF 基因; Ras/Raf/MEK/ERK 通路; 林奇综合征; BRAF 抑制剂

中图分类号: R 735.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2018)08-1124-03

结直肠癌(CRC)是常见的恶性肿瘤。虽然近年来得益于早期筛查的普及和诊疗水平的提高,其发病率、死亡率较前稍有下降^[1],但仍居恶性肿瘤前列。美国癌症协会最新统计数据[2]显示,2017 年美国新诊断结直肠癌约 135 430 例,居所有恶性肿瘤第四位,死亡人数 50 260 例,居第二位^[2]。我国的数据同样不乐观。对我国 72 个地区的癌症注册数据进行统计总结,推断 2015 年我国结直肠癌共有 376.3 千例新发病例和 191.0 千例死亡病例,发病率和死亡率均排恶性肿瘤第五位^[3]。可见结直肠癌对人们的生命健康造成极大威胁,开发更为有效的检测和治疗手段显得尤为重要。肿瘤学领域相关研究现已聚焦到分子层面,多种基因突变在结直肠癌的发生、发展、治疗中的作用备受关注,BRAF 基因(又名鼠类肉瘤滤过性毒菌致癌同源体 B1)是目前的研究热点之一,其在 CRC 的发生、发展、治疗中所起的作用日益受到重视。

1 BRAF 与 Ras/Raf/MEK/ERK 通路

BRAF 基因位于 7 号染色体,可编码一种丝/苏氨酸特异性激酶,称为 B-Raf 蛋白,其在 Ras/Raf/MEK/ERK 信号通路中起到重要的转导作用,参与调控细胞的生长、分化、凋亡等事件^[4-6]。B-Raf 蛋白由 766 个氨基酸构成,具有 3 个保守的结构域(conserved region, CR):CR1 为 Ras 结合域,CR2 富含丝/苏氨酸残基,CR3 为 ATP 结合位点和激活区,是发挥磷酸激酶作用的最主要区域^[7]。当细胞膜上的受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RPTKs)与表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)、血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)等配体结合后,其蛋白激酶功能被激活,尾部的酪氨酸残基磷酸化,并与接头蛋白生长因子受体结合蛋白 2(growth factor receptor binding protein 2, Grb2)、鸟苷酸交换因子 Sos(son-of sevenless)蛋白形成复合物,促使 Ras 蛋白释放 GDP、结合 GTP 而被激活^[8]。激活后,Ras-GTP 结合到 B-Raf 蛋白 N 端的结构域引发其构象变化,启动 Raf 蛋白的激活,活化后的 Raf 蛋白作为 MAPKKK(MAPK kinase kinase)进

一步引起 MEK/MAPKK(MAPK kinase)、ERK/MAPK 磷酸化的瀑布式级联反应,信号最终传导至细胞核内,c-myc、c-fos、c-jun、AP-1 等多种转录因子被激活,影响细胞的生长^[9]。这是存在最广泛的一条通路,此外 ras 蛋白还可激活磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/AKT 等通路,并且不同通路间存在交叉作用。蛋白激酶 A(protein kinase A, PKA)、环腺苷酸结合蛋白(exchange protein directly activated by cAMP, EPAC)等多种蛋白也可激活 B-raf 蛋白,形成错综复杂的信号网络结构^[10]。Ras/Raf/MEK/ERK 通路的具体细节见图 1。

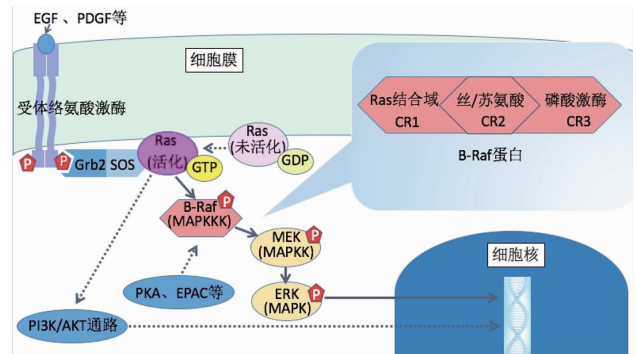


图 1 Ras/Raf/MEK/ERK 通路

BRAF 基因突变与多种肿瘤的发生相关,且突变频率在不同类型肿瘤中变化很大,其中在黑色素瘤、甲状腺乳头状癌、非小细胞肺癌、毛细胞白血病、CRC 等中占比较大^[11]。与人类肿瘤相关的 BRAF 基因突变已检测到 30 多种,其中 90% 以上的突变是由于核苷酸 1799 位腺嘌呤取代胸腺嘧啶(c1799 T > A),导致第 600 号密码子缬氨酸突变为谷氨酸(V600E)。BRAF 突变后,一方面使 Ras/Raf/MEK/ERK 通路持续磷酸化,另一方面抑制促凋亡因子 BIM 的作用^[12],导致细胞异常增殖分化并最终发生肿瘤^[13]。把有共同基因突变的不同类型肿瘤放在一起研究的方法是较新的篮式研究设计(basket study)^[14],这类肿瘤在发病机制上具有某些共性,治疗方法上

也可适当类推和借鉴,可使我们更好地加深对肿瘤分子机制的了解。

2 BRAF 突变检测在 CRC 中的作用

研究显示欧美地区 CRC 患者中 BRAF 突变率为 8% ~ 15%^[15-16],中国地区为 3.8% ~ 5.1%^[17]。中国地区基因突变率较国外低,一方面可能跟人种相关,另一方面国内多中心、大规模研究相对少,数据可能较西方有偏差。如今 BRAF 突变在 CRC 的发生、发展、治疗中所起的作用日益受到重视,具体如下。

2.1 BRAF 突变检测可辅助 CRC 的鉴别诊断 BRAF 突变检测阳性提示散发型结直肠癌 (sporadic colorectal cancer, sCRC),可排除林奇综合征 (Lynch syndrome, LS)。LS 是由胚系错配修复 (mismatch repair, MMR) 基因突变所致的常染色体显性遗传疾病,具有发病早、CRC 及其他系统恶性肿瘤发生率高、遗传倾向明显等特点,尽早确诊对此类患者极为重要。目前公认最密切的 4 个 MMR 基因为 MLH1、MSH2、MSH6、PMS2,前两者比例最大,可占到所有突变的 90%^[18]。MMR 蛋白免疫组化联合 BRAF 检测是迅速有效的筛查手段:若 4 种 MMR 蛋白表达均正常,可排除 LS;若 MMR 蛋白表达缺失,需具体分析 MLH1、MSH2、MSH6 及 PMS2 的表达情况;若 MLH1 缺失,则进行 BRAF 突变分析,如存在 BRAF 突变,提示是由于体细胞 MLH1 基因启动子区域甲基化引起的表达下降,非 MMR,进而排除 LS 而提示 sCRC。此方法有效的简化了 LS 的诊断流程,也是美国国家综合癌症网络 (NCCN) 和欧洲临床肿瘤协会 (ESMO) 指南建议的检测方案^[19-20]。

2.2 BRAF 突变可帮助预测 CRC 的特点和预后 研究提示, BRAF 突变与 CRC 近端肠道发病、高龄、女性、高级别组织学分级、黏液腺癌这些特点相关联,并且对生存期的影响与微卫星不稳定 (microsatellite instability, MSI) 的程度有关。在低频微卫星不稳定 (low MSI, MSI-L) 与微卫星稳定 (microsatellite stable, MSS) 患者中, BRAF 突变预示着预后更差,生存期 (总生存期、无病生存期或肿瘤特异性生存期) 缩短,尤其是在 MSS^[21-22]。而在高频微卫星不稳定 (high MSI, MSI-H) 中,其预测作用并不明确^[15]。另外, MRC FOCUS 研究提示, BRAF V600E 突变与中晚期 CRC 的预后不良相关^[23]。一项包含 26 个 CRC 研究的荟萃分析发现, BRAF 突变增加了 1 倍以上的死亡风险 ($HR = 2.25, 95\% CI: 1.82 \sim 2.83$), BRAF 突变是 CRC 患者生存的绝对危险因素^[24]。

2.3 BRAF 突变影响 CRC 治疗方案的选择

2.3.1 BRAF 突变影响抗 EGFR 单克隆抗体的治疗效果 表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 在 CRC 的发生、发展、预后中起到重要作用已得到公认,抗 EGFR 单克隆抗体帕尼单抗 (panitumumab) 或西妥昔单抗 (cetuximab) 也已成熟运用于 CRC 的临床治疗,而野生型 BRAF 基因对抗 EGFR 单克隆抗体的有效性是必须的。Di 等^[25]对 79 例 KRAS 野生型 CRC 患者进行 BRAF 检测, 11 例存在 BRAF V600E 突变,而在 panitumumab 或 cetuximab 疗效的观察中,上述 11 例患者均对治疗无反应;反过来对治疗产生反应的患

者,均未发现 BRAF 突变。因此 BRAF 基因检测也用来进行接受抗 EGFR 单克隆抗体患者的筛选。

2.3.2 单用 BRAF V600E 选择性抑制剂效果欠佳 由于 BRAF 突变在多种肿瘤的发生、发展中起到重要作用,越来越多的临床试验开始研究其选择性抑制剂对肿瘤的治疗效果。BRAF V600E 选择性抑制剂维罗非尼 (vemurafenib, PLX4032) 于 2011 年获美国食品药品监督管理局批准,用于 V600E 突变阳性的无法手术切除或转移性黑色素瘤的治疗,并取得 50% 以上的临床缓解率,具有明显的生存获益^[26-27]。但 vemurafenib 在 CRC 的治疗效果令人失望,在 1 项纳入 21 例 CRC 患者的试验中,仅有 1 例患者达到 RECIST 标准的部分缓解,缓解率为 5% (95% CI: 1% ~ 24%)^[28]。这提示单一针对 BRAF V600E 的靶向治疗在 CRC 难以实现。并且,同一类型的基因突变产生如此巨大的疗效差别,也提示肿瘤细胞内在信号通路的复杂性。

2.3.3 联合使用靶向药物获益更大 Prahallad 等^[29]研究了 CRC 对 BRAF 抑制剂抵抗的可能机制,认为 BRAF 抑制剂可反馈激活 EGFR,信号可通过 PI3K/AKT 等通路继续发挥作用,绕过了 MAPK 通路,联合使用 BRAF 抑制剂和 EGFR 抑制剂可能使 BRAF V600E 突变的 CRC 患者受益。Yang 等^[30]在 BRAF V600E 突变的 CRC 细胞系的移植模型上进行一系列组合疗法的探讨,提出 vemurafenib 联合 EGFR 或 AKT 抑制剂和/或化疗药物可提高治疗效果。BRAF 抑制剂达拉非尼 (dabrafenib) + EGFR 抑制剂 panitumumab + MEK 抑制剂曲美替尼 (trametinib) 以及 BRAF 抑制剂 encorafenib + EGFR 抑制剂 cetuximab + PI3K 抑制剂 alpelisib 的三联疗法均有较好的前景,目前仍在临床试验当中^[31]。

3 展望

CRC 在国内外均有较高的发病率和死亡率,对人们的生命健康产生极大威胁,引发人们对其发病机制的深入探索。B-Raf 蛋白在 Ras/Raf/MEK/ERK 通路中起到重要的转导作用,这是与细胞增殖和凋亡关系最密切的信号传导通路之一。当 BRAF 基因发生突变时,该通路持续激活,促进多种肿瘤的发生。对 BRAF 突变的检测,在 CRC 的鉴别诊断、预测疾病特点和预后、指导治疗方案的选择中均起到重要作用。针对 BRAF 展开如此多的研究,更重要的是将其作为治疗靶点改善预后。但在存在 BRAF 突变的 CRC 患者中使用 BRAF 抑制剂,治疗效果很不理想,这与同样存在 BRAF 突变的黑色素瘤相差甚远。这提示我们,肿瘤的发生发展中信号通路多样而复杂。BRAF 抑制剂和 EGFR、MEK、PI3K 抑制剂以及化疗药的联合使用,或许可以更好的封锁各条必经的信号通路,取得更大的获益。

参考文献

- [1] Fedewa SA, Ma J, Sauer AG, et al. How many individuals will need to be screened to increase colorectal cancer screening prevalence to 80% by 2018 [J]. Cancer, 2015, 121 (23): 4258 - 4265.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017 [J]. CA Canc-

- er J Clin, 2017, 67(1): 7-30.
- [3] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [4] Sithanandam G, Kolch W, Duh FM, et al. Complete coding sequence of a human B-raf cDNA and detection of B-raf protein kinase with isozyme specific antibodies [J]. Oncogene, 1990, 5(12): 1775-1780.
- [5] Sithanandam G, Druck T, Cannizzaro LA, et al. B-raf and a B-raf pseudogene are located on 7q in man [J]. Oncogene, 1992, 7(4): 795-799.
- [6] Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer [J]. Nature, 2002, 417(6892): 949-954.
- [7] Cutler RE Jr, Stephens RM, Saracino MR, et al. Autoregulation of the Raf-1 serine/threonine kinase [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(16): 9214-9219.
- [8] Zarich N, Oliva JL, Martínez N, et al. Grb2 is a negative modulator of the intrinsic Ras-GEF activity of hSos1 [J]. Mol Biol Cell, 2006, 17(8): 3591-3597.
- [9] Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions [J]. Biochem J, 2000, 351 Pt 2: 289-305.
- [10] Grewal SS, Horgan AM, York RD, et al. Neuronal calcium activates a Rap1 and B-Raf signaling pathway via the cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase [J]. J Biol Chem, 2000, 275(5): 3722-3728.
- [11] Namba H, Nakashima M, Hayashi T, et al. Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2003, 88(9): 4393-4397.
- [12] Wickenden JA, Jin H, Johnson M, et al. Colorectal cancer cells with the BRAF (V600E) mutation are addicted to the ERK1/2 pathway for growth factor-independent survival and repression of BIM [J]. Oncogene, 2008, 27(57): 7150-7161.
- [13] Tan YH, Liu Y, Eu KW, et al. Detection of BRAF V600E mutation by pyrosequencing [J]. Pathology, 2008, 40(3): 295-298.
- [14] Hyman DM, Puzanov I, Subbiah V, et al. Vemurafenib in multiple nonmelanoma cancers with BRAF V600 mutations [J]. N Engl J Med, 2015, 373(8): 726-736.
- [15] Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, et al. Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial [J]. J Clin Oncol, 2010, 28(3): 466-474.
- [16] Russo AL, Borger DR, Szymonifka J, et al. Mutational analysis and clinical correlation of metastatic colorectal cancer [J]. Cancer, 2014, 120(10): 1482-1490.
- [17] Liou JM, Wu MS, Shun CT, et al. Mutations in BRAF correlate with poor survival of colorectal cancers in Chinese population [J]. Int J Colorectal Dis, 2011, 26(11): 1387-1395.
- [18] Lu JY, Sheng JQ. Advances in the study of Lynch syndrome in China [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(22): 6861-6871.
- [19] Roth RM, Hampel H, Arnold CA, et al. A modified lynch syndrome screening algorithm in colon cancer: BRAF immunohistochemistry is efficacious and cost beneficial [J]. Am J Clin Pathol, 2015, 143(3): 336-343.
- [20] Molinari F, Signoroni S, Lampis A, et al. BRAF mutation analysis is a valid tool to implement in Lynch syndrome diagnosis in patients classified according to the Bethesda guidelines [J]. Tumori, 2014, 100(3): 315-320.
- [21] Ogino S, Shima K, Meyerhardt JA, et al. Predictive and prognostic roles of BRAF mutation in stage III colon cancer: results from intergroup trial CALGB 89803 [J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(3): 890-900.
- [22] Thiel A, Ristimäki A. Toward a molecular classification of colorectal cancer: the role of BRAF [J]. Front Oncol, 2013, 3: 281.
- [23] Richman SD, Seymour MT, Chambers P, et al. KRAS and BRAF mutations in advanced colorectal cancer are associated with poor prognosis but do not preclude benefit from oxaliplatin or irinotecan: results from the MRC FOCUS trial [J]. J Clin Oncol, 2009, 27(35): 5931-5937.
- [24] Safaei Ardekani G, Jafarnejad SM, Tan L, et al. The prognostic value of BRAF mutation in colorectal cancer and melanoma: a systematic review and meta-analysis [J]. PLoS One, 2012, 7(10): e47054.
- [25] Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer [J]. J Clin Oncol, 2008, 26(35): 5705-5712.
- [26] Salama AK, Flaherty KT. BRAF in melanoma: current strategies and future directions [J]. Clin Cancer Res, 2013, 19(16): 4326-4334.
- [27] Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, et al. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib [J]. N Engl J Med, 2012, 366(8): 707-714.
- [28] Kopetz S, Desai J, Chan E, et al. Phase II pilot study of vemurafenib in patients with metastatic BRAF-mutated colorectal cancer [J]. J Clin Oncol, 2015, 33(34): 4032-4038.
- [29] Prahallad A, Sun C, Huang S, et al. Unresponsiveness of colon cancer to BRAF (V600E) inhibition through feedback activation of EGFR [J]. Nature, 2012, 483(7387): 100-103.
- [30] Yang H, Higgins B, Kolinsky K, et al. Antitumor activity of BRAF inhibitor vemurafenib in preclinical models of BRAF-mutant colorectal cancer [J]. Cancer Res, 2012, 72(3): 779-789.
- [31] Masuishi T, Muro K. Current progress and feasibility of using molecular-targeted agent combinations for metastatic colorectal cancer [J]. Gan To Kagaku Ryoho, 2016, 43(4): 408.