

# 结直肠癌分子标志物临床检测中国专家共识



扫码阅读电子版

中国临床肿瘤学会(CSCO)结直肠癌专家委员会

通信作者:袁瑛,Email:yuanying1999@zju.edu.cn;张苏展,Email:zhangscy@tom.com

**【摘要】** 结直肠癌是目前我国发病率及死亡率最高的恶性肿瘤之一。随着精准医疗理念及对肿瘤相关分子标志物研究的逐年深入,合理的检测及应用结直肠癌相关分子标志物已经成为目前临床实践的重要部分。为了提高临床医师对结直肠癌分子标志物的了解及应用,中国临床肿瘤学会(CSCO)结直肠癌专家委员会组织相关领域专家,根据近年的国内外临床研究及实际诊疗经验,经专家组反复修改讨论,撰写了结直肠癌分子标志物临床检测的专家共识,旨在为临床医师提供参考及指导,为结直肠癌患者提供更加精准、有效的治疗。

**【关键词】** 结直肠肿瘤; 分子标志物; 基因, *RAS*; 基因, *BRAF*; 第二代测序; 共识

**基金项目:**国家重点研发计划项目(2018YFC1312100)

DOI:10.3760/cma.j.cn.441530-20201225-00679

## Consensus of Chinese experts on clinical detection of molecular markers of colorectal cancer

Colorectal Cancer Expert Committee of Chinese Society of Clinical Oncology (CSCO)

Corresponding authors: Yuan Ying, Email: yuanying1999@zju.edu.cn; Zhang Suzhan, Email: zhangscy@tom.com

**【Abstract】** Colorectal cancer is one of the malignant tumors with the highest morbidity and mortality in China. With the research of precision medicine concept and tumor-related molecular markers, appropriate detection and application of colorectal cancer-related molecular markers has become an important part of current clinical practice. In order to effectively solve the current clinical problems and improve clinicians' understanding and application of molecular markers on colorectal cancer, the Chinese Society of Clinical Oncology (CSCO) Colorectal Cancer Expert Committee organized experts in related fields to write an expert consensus on molecular markers of colorectal cancer based on recent domestic and international clinical trial and clinical experience. The consensus mainly provides guidance on testing specimens, molecular markers and testing methods, and interpretation of testing results. It aims to provide clinicians with standardized clinical reference for diagnosis and treatment, and standard and effective treatment for patients with colorectal cancer.

**【Key words】** Colorectal neoplasms; Molecular markers; Gene *RAS*; Gene *BRAF*; Next generation sequencing; Consensus

**Fund program:** National Key R&D Program Projects (2018YFC1312100)

DOI:10.3760/cma.j.cn.441530-20201225-00679

结直肠癌是人类最常见的恶性肿瘤之一,全球发病率居恶性肿瘤第3位,死亡率居第2位。在我国,结直肠癌发病率亦呈现逐年上升趋势。根据2019年国家癌症中心数据显示,2015年中国结直肠癌新发病例38.8万,死亡病例18.7万<sup>[1]</sup>。结直肠癌的早期筛查及预防可以降低发病率、提高治愈率,相关分子标志物的检测是结直肠癌筛查的有效补充,同时对个体化方案的判定、预后判断及疗效预测等方面起到重要作用。本共识综合国内相关领域专家临床实践经验及国内外相关领域的研究成果,旨在为结直肠癌分子标志物的临床检测及临床实践提供规范及指导。

本共识对结直肠癌治疗中与方案选择和预后判断有关的分子标志物的检测标本、检测方法以及检测结果的解读提供了指导意见。其中每个分子标志物检测的适应证和时机见图1。

### 一、检测标本

目前在临床中,用于结直肠癌分子标志物检测的标本来源主要为患者的肿瘤组织标本以及外周血标本,其中外周血标本又涵盖了外周血有核细胞、血液无细胞液体成分及循环肿瘤细胞(circulating tumor cell, CTC)。肿瘤组织检测可反映肿瘤的体细胞突变,而外周血标本中,血有核细胞的基因检测代表患者的胚系突变,CTC基因检测代表的是肿瘤的体细胞突变,而血液无细胞液体成分中的循环无细胞DNA(circulating free DNA, cfDNA)既可能源自肿瘤细胞,也可能源自血有核细胞<sup>[2]</sup>。

1. 肿瘤组织标本:肿瘤组织标本中具有较富集的肿瘤细胞,可更真实地反映肿瘤中基因的变异情况,但由于无法区分突变是体细胞突变还是胚系突变,因此不能用于遗传性疾病如林奇综合征的诊断。肿瘤组织标本又可根据其来源分为原发灶标本和转移灶标本。对于结直肠癌相关*KRAS*、*NRAS*和*BRAF*基因的突变,在原发灶标本和转移灶标本中的一致性非常高。

2. 外周血标本:外周血有核细胞标本能明确反映胚系突变情况,可用于遗传性患者的诊断。但外周血有核细胞不能

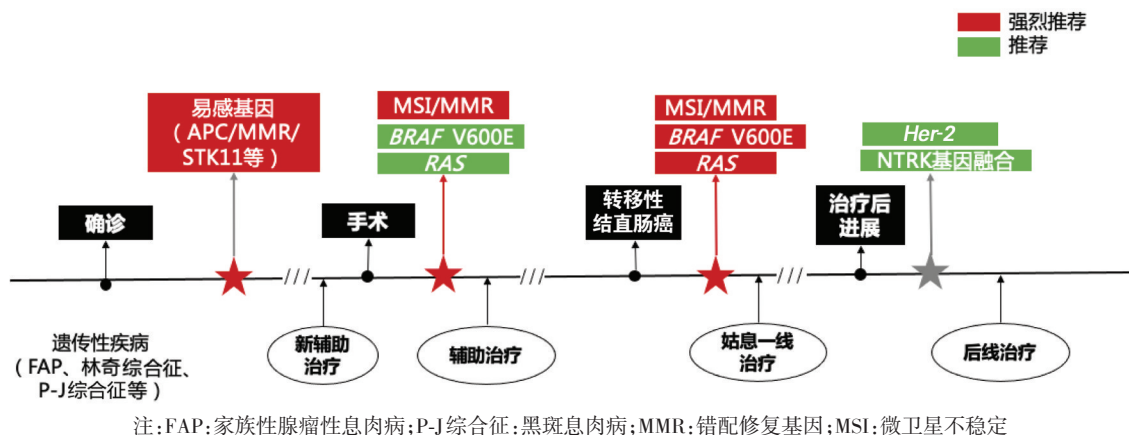


图1 结直肠癌分子标志物检测的适应证与时机

反映肿瘤组织的体细胞突变,无法帮助临床预测相关药物的治疗效果。外周血有核细胞标本基因检测时要注意CTC可能带来的干扰。

转移性结直肠癌(metastatic colorectal cancer, mCRC)既往的基因检测标准方法是组织活检,但存在若干缺点,包括人体侵入性、获得样本的技术难度较高等。近年来,微侵入性的液体活检技术显示出良好的应用前景。对外周血进行分离纯化后可以检测CTC或者cfDNA。cfDNA是指游离于血液中的细胞外DNA,主要来源于衰老、凋亡的血细胞和肿瘤细胞释放的片段化DNA,因此可以表达来自肿瘤DNA。循环肿瘤DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)是肿瘤细胞凋亡后进入血液的游离DNA,是cfDNA的一种,其监测或能更早地预测疾病复发<sup>[3-4]</sup>;为术前新辅助治疗及术后辅助治疗的疗效评估提供参考<sup>[5-7]</sup>。但目前尚缺乏特异性验证和可靠的重复试验。

目前,cfDNA的液体活检仍处于探索阶段,尚存在较多问题和挑战。外周血中ctDNA的含量较低,分离和纯化ctDNA具有一定难度,ctDNA在cfDNA中的占比较小,正常血细胞来源的DNA同样会对检测结果造成干扰。cfDNA在血液中的半衰期仅1.0~2.4 h,因此标本的取样、制备和存储等环节均有较高难度,极易造成结果不准确。此外,样本较易受到外部因素影响而不能正确反映患者肿瘤中的突变情况。因此,目前cfDNA液体活检仅推荐作为临床研究探索性应用。

此外,CTC也是外周血标本中的重要部分。CTC是从原发或继发肿瘤脱落进入循环的肿瘤细胞。因循环中的肿瘤细胞分布相对稀少,CTC的检测过程主要分为两步,即细胞的分离富集和富集细胞的鉴定。目前,CTC及相关分子标志物检测的临床应用仍在探索中,可能对于疾病的早期筛查、预后判断和疗效评估有一定作用<sup>[4]</sup>。

## 二、检测方法

目前,分子标志物的检测方法包括免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)、荧光原位杂交技术(fluorescence in situ hybridization, FISH)和基因测序等。不

同类型的标本和变异需要选择不同的检测方法。

IHC操作简单,费用低,目前已在临床广泛使用。它主要用于检测蛋白的表达,但不能反映基因变异情况,目前只用于筛查。FISH在临床中广泛用于基因扩增、缺失及倒位异位的检测。基因测序方法中,Sanger测序法及荧光定量PCR费用适中,是临床检测中用于检测基因变异的传统技术,但只能检查一个基因特定范围内的突变,目前是在结直肠癌分子标志物检测中使用最多的检测方法。第2代测序(next-generation sequencing, NGS)因其检测的高通量,一次检测可以包含几十个、上百个甚至整个基因组的变异情况,对于需要同时检测很多个基因、但样本量又有限的病例,具有较大优势。

随着对结直肠癌发病机制的深入研究和基因检测能力的提高,与结直肠癌发病和治疗相关的基因越来越多。目前,国内外已有的相关指南及实践推荐检测的结直肠癌相关基因包括APC、MMR、RAS和BRAF等。与此同时,对于其他一些具有潜在临床意义的基因也得到越来越多的关注,包括Her-2扩增/过表达、PIK3CA突变和NTRK融合等。

### (一)常规分子标志物检测

1. RAS基因点突变:KRAS和NRAS是由RAS家族成员基因编码的两种GTP酶蛋白,参与表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的信号转导,调控细胞生长、分化、增殖和存活。40%~50%的结直肠癌患者存在KRAS点突变<sup>[8]</sup>;3.8%的结直肠癌存在NRAS基因点突变<sup>[9]</sup>。需要检测的位点包括KRAS和NRAS基因的第2、3、4号外显子。RAS点突变可以采用的检测方法包括:Sanger测序法、PCR和NGS。当可以得到肿瘤细胞较为丰富的结直肠癌组织标本时,RAS点突变可以使用Sanger测序法,其优点是对设备要求低,价格便宜。此外,因为RAS突变是已知位点和已知突变类型,因此,也可以通过设计引物和探针进行PCR检测,是目前运用最普遍的检测方法。根据目前现有指南及临床实践,推荐以5%作为组织学的RAS基因检测的突变丰度截断值<sup>[10]</sup>。目前已有多项临床研究表明,RAS野生型的晚期结直肠癌患者能从抗EGFR单抗治疗中获益,患者的总生

存时间显著延长<sup>[11-13]</sup>。尤其对于原发灶位于左半结肠和直肠的患者,接受化疗联合抗 EGFR 单抗治疗的患者中位总生存期可达到 55 个月以上<sup>[14]</sup>。因此,对于这部分患者推荐首选化疗联合抗 EGFR 单抗的治疗方案<sup>[11-12]</sup>。而对于 RAS 基因突变患者,应用抗 EGFR 单抗则无明显获益,一般采用化疗联合 VEGF 单抗治疗。因此,推荐在 mCRC 患者开始治疗前,应进行 RAS 突变的检测,有助于帮助患者选择最佳的个体化治疗方案。

**2. BRAF 基因点突变:** BRAF 基因作为 RAF 原癌基因家族的成员,位于 RAS 基因下游,是 RAS-RAF-MEK 激酶通路上的关键成员。在亚洲结直肠癌患者中, BRAF 突变率为 5.4%~6.7%<sup>[15]</sup>。另有研究显示, BRAF 基因突变的转移性结直肠癌患者中, 90% 为 BRAF V600E 突变<sup>[16]</sup>。与 RAS 点突变相似, BRAF 突变可以采用的检测方法也包括: Sanger 测序法、PCR 和 NGS。目前运用最普遍的也是 PCR 检测。NCCN 指南和 CSCO 指南对 BRAF V600E 突变 mCRC 患者的二线治疗均推荐西妥昔单抗+伊立替康+维莫非尼(BRAF 抑制剂),或者西妥昔单抗+BRAF 抑制剂±MEK 抑制剂的联合方案<sup>[17-18]</sup>。 BRAF 基因状态对结直肠癌患者的预后评估也具有指导意义<sup>[18-20]</sup>。 BRAF V600E 突变患者相比其他患者预后更差,生存时间更短<sup>[21]</sup>。另外,对于林奇综合征的诊断, MLH1 突变患者必须加做 MLH1 甲基化或 BRAF V600E 突变检测,如有 BRAF V600E 突变则不能确诊为林奇综合征。因此,推荐在结直肠癌患者中进行 BRAF V600E 突变检测,可用于选择个体化治疗方案、帮助林奇综合征的诊断以及患者的预后判断。

**3. 微卫星不稳定(microsatellite instability, MSI)状态和错配修复(mismatch repair, MMR)蛋白表达:** MSI 状态和 MMR 蛋白表达是包括结直肠癌在内的泛瘤种免疫检查点抑制剂效果的预测指标<sup>[22-24]</sup>。对于 MSI 检测,目前主要以多重荧光 PCR 毛细管电泳技术为主。对相关细胞 DNA 微卫星的长度改变来决定 MSI 状况。根据微卫星的不同状况可将患者分为 3 种,即:高度微卫星不稳定(MSI-H)、低度微卫星不稳定(MSI-L)和微卫星稳定(micro-satellite stable, MSS)。通常采用美国国家癌症研究所推荐的 5 个微卫星位点进行检测,当 ≥2 个微卫星位点显示 MSI,即可诊断为 MSI-H; 1 个显示 MSI,可诊断为 MSI-L; 没有任何位点显示 MSI,即 MSS<sup>[25]</sup>。

MMR 蛋白的 IHC 检测,需同时检测 4 个常见 MMR 蛋白(MLH1、MSH2、MSH6 和 PMS2)的表达。其中 ≥1 种表达缺失,判定为错配修复基因缺陷(dMMR); 全部阳性,则判定为错配修复基因完整(pMMR)。一般而言, dMMR 相当于 MSI-H, pMMR 相当于 MSI-L 或 MSS。

MSI-H 状态的 II 期和 III 期结直肠癌患者,其预后一般优于 MSS 患者。MSI-H 的 II 期患者,一般预后较好,且不能从氟尿嘧啶(5-FU)类单药化疗中获益,所以建议 II 期患者术后常规进行 MSI 检测。此外,转移性 MSI-H/dMMR 患者对于免疫检查点抑制剂疗效较好。Checkmate142 研究表明,纳武单抗有效率为 31%<sup>[26]</sup>。而非 MSI-H/dMMR 患者有效率则显著较低。KEYNOTE-177 研究表明, MSI-H/dMMR 患者姑息一

线应用帕博利珠单抗,客观缓解率为 43.8%,而标准化疗靶向组显著较低,为 33.1%<sup>[27]</sup>。MSI/MMR 状态对于遗传性结直肠癌的诊断也具有较大的意义,尤其是林奇综合征的诊断, MMR 基因的胚系突变是确诊的金标准。因此,对于临床考虑遗传性结直肠癌的患者,应推荐常规进行 MSI/MMR 状态以帮助诊断;而对于其他结直肠癌患者,完善 MSI/MMR 状态的检测可为后续治疗选择提供参考依据。

**专家意见 1:** 对于所有 mCRC 患者,均推荐在综合治疗前行常规分子标志物检测(RAS 基因突变、BRAF 基因突变、MSI 状态/MMR 蛋白表达),根据结果制定个体化治疗方案;推荐对于所有临床怀疑林奇综合征的患者,检测 MSI 状态/MMR 蛋白表达进行遗传筛查。

## (二)其他分子标志物检测

除上述常用分子标志物外,目前,其他潜在的分子标志物在结直肠癌中的发生率低,临床意义及靶向治疗的反应性尚在评价中,如 Her-2 扩增/过表达、PIK3CA 突变、NTRK 融合和肿瘤突变负荷(tumor mutational burden, TMB)。

**1. Her-2:** Her-2 是 EGFR 基因家族成员,其作为结直肠癌的原癌基因之一,可通过激活 RAS-RAF-MEK 和 PI3K-AKT-mTOR 通路,抑制肿瘤细胞凋亡,促进肿瘤新生血管形成。结直肠癌中 Her-2 扩增/过表达的总体发生率约为 5%<sup>[28]</sup>,与 KRAS、NRAS 和 BRAF 突变存在相互排斥,且在原发肿瘤与转移瘤之间高度一致。推荐对于经标准治疗失败后的 mCRC 患者可进行 Her-2 扩增/过表达的检测。目前,结直肠癌 Her-2 的检测方法和判断标准均来自临床研究方案,尚未建立经过权威机构认证的、作为伴随诊断的检测流程和判读标准。NCCN 指南和 CSCO 指南目前均推荐 Her-2 扩增/过表达患者可接受抗 Her-2 靶向药物的治疗,两个指南的差别在于 CSCO 指南推荐在姑息三线及三线治疗以后使用,而 NCCN 指南则对姑息一线、不能耐受高强度治疗的患者也有抗 Her-2 治疗的推荐<sup>[17-18]</sup>。

**2. NTRK 基因融合:** NTRK 基因融合在结直肠癌中比较罕见,发生率为 0.35%。NTRK 抑制剂仅对携带 NTRK 融合的患者有效,而对突变患者无效。IHC 是一种有效,快速的初筛方法, IHC 阳性的肿瘤需使用 FISH、PCR 或 NGS 方法进一步验证。由于 NTRK 基因融合发生率极低,目前仅推荐在标准治疗失败后、或者筛选临床研究的患者中进行检测。

**3. PIK3CA 突变:** 在中国人群中 PIK3CA 突变率仅为 3.5%,与 RAS 信号通路共同构成 EGFR 下游两条平行通路。与 RAS 和 BRAF 基因突变的排他性不同, PIK3CA 突变可与 RAS 突变共同存在。根据部分已有的研究结果, PIK3CA 突变可能是对阿司匹林治疗有效的预测标志物,但各研究之间尚缺乏较好的一致性<sup>[29]</sup>。此外,由于 PIK3CA 突变与抗 EGFR 单抗疗效的相关性目前尚不能完全确定,因此,目前尚不推荐对结直肠癌患者常规行 PIK3CA 突变检测。

**4. TMB:** TMB 是肿瘤组织 DNA 中基因组突变数的指数,它是测量肿瘤体细胞内编码蛋白的平均 1Mb 范围内的碱基突变数量,包括基因编码错误、碱基替换、基因插入或缺失等

各种形式的突变。FDA于2020年6月批准了免疫检查点抑制剂用于治疗高肿瘤突变负荷(TMB-H $\geq$ 10个突变/兆碱基)的无法切除或转移性实体瘤的成人和儿童患者。目前在结直肠癌中尚不推荐常规行TMB检测。

**专家意见 2:**对于经标准治疗失败的mCRC患者,可进行*Her-2*扩增/过表达和*NTRK*基因融合的检测;*PIK3CA*突变检测和TMB检测仅限研究使用。

### (三)遗传易感性基因检测

对结直肠癌的遗传易感性基因的检测需要在胚系细胞中检测才能明确。严格意义的胚系细胞是指精子和卵子。考虑到样本采集的便利性,临床上常用外周血淋巴细胞或口腔黏膜细胞代替。在结直肠癌中发现的突变如果在外周血淋巴细胞或口腔黏膜细胞中得到证实,就可推定患者所有细胞都携带有该突变,可以认为是胚系突变。与结直肠癌遗传易感性相关的基因包括*APC*、*MMR*和*STK-11*等基因。其中,*APC*基因的突变和家族性腺瘤性息肉病(familial adenomatous polyps, FAP)有关,其基因型和临床表型存在相关性,即碱基突变的位置和息肉发生的严重程度有关。如怀疑FAP而*APC*基因无突变者,还需要进一步检测*MUTYH*基因突变。遗传性非息肉病性结直肠癌(林奇综合症)是一种常染色体显性遗传性疾病,其发病与*MMR*基因的胚系突变有关。*MLH1*、*MSH2*、*MSH6*和*PMS2*是最常见发生突变的4个*MMR*。大约70%的林奇综合征患者是由*MSH2*和*MLH1*突变所致,其余30%多由*MSH6*和*PMS2*突变所致。

**专家意见 3:**对于临床上怀疑诊断家族性息肉病、林奇综合征和P-J综合征等家族遗传性疾病者,推荐行相关遗传易感性基因的胚系突变检测。

### (四)结直肠癌相关蛋白表达检测

IHC检测是指用标记的特异性抗体在组织细胞原位通过抗原抗体反应和组织化学的呈色反应,对相应抗原进行定性、定位、定量测定的一项免疫检测方法。IHC检测是肿瘤诊疗中的重要工具,对判定肿瘤来源、类型、恶性程度、耐药和预后都提供了重要价值。本文主要描述了与结直肠癌鉴别诊断/辅助诊断有关的IHC标志物,包含但不限于如下标志物。

**专家意见 4:**对于结直肠癌患者,推荐对经手术切除或

活检的原发灶或转移灶组织标本行相关分子标志物的蛋白表达水平检测,以帮助判定肿瘤来源和类型。

### 三、检测结果的解读

前已述及,目前主要的分子标志物检测方法包括IHC、FISH和基因测序等。在对结直肠癌基因检测报告进行解读时,需对样本的来源、检测方法、检测覆盖的基因、变异类型、检测结果等方面进行详细解读。

#### (一)标本类型

标本类型包括肿瘤组织样本和外周血样本,其中外周血样本又可细分为外周血有核细胞、外周血无细胞液体成分和CTC等。这些样本既有体细胞来源的,也有胚系细胞来源。在使用肿瘤样本进行基因突变检测时,由于原发灶和转移灶可能有异质性的存在,因此在基因检测报告中需要说明检测样本来源。

#### (二)肿瘤细胞的比例

不同的检测方法对基因突变频率的敏感性不同。需要在检测报告中说明,本次受检的肿瘤组织样本中肿瘤细胞的比例是否符合检测方法的要求。如果不符合,需要在检测结果为阴性的报告中说明,以提示存在假阴性的可能。一般要求肿瘤细胞的比例至少要高于30%。CTC检测应在获得外周血样本2h内进行,同时,在报告中还应注明富集的CTC数量。对于结直肠癌患者而言,不建议用外周血样本的检测阴性结果来指导抗EGFR单抗药物的治疗,以避免假阴性所造成的靶向药物不获益。

#### (三)检测方法

不同类型的突变和不同类型的样本,需要选择不同的检测方法。在报告中说明检测方法和该方法的局限性,对于正确理解检测结果具有重要意义。第一代测序及荧光定量PCR,只能检测特定区域或特定位点的基因突变,对于超过检测范围的突变位点、或罕见突变位点,则不能被检出。FISH技术只能检测基因的扩增、缺失、异位倒位,而不能检测基因的点突变。IHC技术只能用于蛋白表达水平的检测。

在传统检测技术的基础上,NGS技术的发展和成熟,为实现单瘤种的所有基因变异以及泛瘤种的热点基因变异进行同时检测成为可能<sup>[30]</sup>。目前的NGS技术主要包括:NGS平台目标区域测序(panel检测)、全外显子组测序(whole exome

表1 与结直肠癌鉴别诊断/辅助诊断有关的免疫组织化学(IHC)标志物

IHC分子标志物	说明
癌胚抗原(CEA)	上皮来源标记,用于内胚层来源肿瘤,少量成人上皮细胞和良性肿瘤亦可表达
细胞角蛋白20(CK20)	胃肠上皮移行上皮Merkel细胞来源标记,神经内分泌肿瘤常阴性,用于鉴别诊断
细胞角蛋白7(CK7)	上皮来源标记,通常在腺癌中表达,腺上皮和移行上皮细胞表达,非上皮来源细胞无表达,胃肠道来源的腺癌多为阴性
D2-40	淋巴管内皮细胞较为特异的标志物,是肿瘤淋巴管形成和淋巴管侵犯的重要标记,用于评估淋巴管密度
富含AT序列特异性结合蛋白2(SATB2)	仅在大脑、消化道组织、骨髓及免疫系统中表达较高,在其他组织中基本不表达。SATB2联合CK7和CK20检测,可提升结直肠癌诊断率
绒毛蛋白(Villin)	绒毛蛋白,刷状缘的上皮细胞表达,在胃肠道恶性肿瘤中阳性表达率高,可用于鉴别诊断

sequencing, WES) 和全基因组测序 (whole genome sequencing, WGS)。目前,用于结直肠癌分子标志物检测的主要是 NGS 中的目标区域测序。NGS 的出现,为同时满足上述所有的检测需求提供了可能<sup>[31-33]</sup>。此外,NGS 对于包括点突变、小片段插入缺失等具有更好的敏感性。对于有家族史的结直肠癌患者,需要同时检测体细胞和胚系基因变异并比对,建议可选择应用 NGS 技术同时进行肿瘤细胞及血液有核细胞的检测。

目前,NGS 检测涵盖的点突变从单瘤种的几十个基因到泛瘤种的上千个基因。除此以外,还常常整合了不同数量的 PCR 检测用于检测基因的扩增、融合和微卫星稳定。对于 NGS 检测结果中的突变丰度值,需综合评估 NGS 实验平台性能、测序深度和肿瘤细胞比例等因素综合考虑。

#### (四) 基因变异类型

1. 点突变:在 *RAS* 和 *BRAF* 基因突变检测时,至少要包含 *KRAS* 和 *NRAS* 基因的第 2、3、4 号外显子及 *BRAF* 基因的 V600E 位点。

2. 插入突变:遗传易感基因 *BRCA1* 和 *BRCA2* 基因编码区(包括 *BRCA1* 外显子 2、3、5-24; *BRCA2* 外显子 2-27) 及外显子-内含子链接区、UTR 区和启动子区的插入突变。

3. 缺失突变: *BRCA1* 部分内含子 20 和外显子 20 跳跃造成的异常剪接。

4. 基因融合:结直肠癌中新兴的生物标志物 *NTRK* 基因融合。

5. 基因扩增: *Her-2* 基因扩增。

6. 基因缺失:遗传易感基因 *TP53*、*RBI* 等基因缺失。

#### (五) 检测结果

1. IHC 报告的模板及重点参数:当以 IHC 作为检测方法时,应注明样本来源、抗体的克隆号以及蛋白表达的百分比。

2. PCR 报告的模板及重点参数:PCR 报告应包括样本来源、肿瘤细胞比例、使用方法、检测位点及范围、突变丰度和基因变异的解读。

3. NGS 报告的重点参数:

(1) 报告基本信息:

检测名称及编号:如“结直肠癌基因变异检测报告 CRC201900001”;

患者基本信息:姓名、年龄、性别和住院号等;

样本信息:病理号、取材部位、样本类型[经甲醛固定石蜡包埋处理的样本 (formalin-fixed and paraffin-embedded, FFPE)、新鲜组织、血液等]、送检医院科室及医师、送检日期和报告日期等;

病理信息:病理诊断、肿瘤细胞比例、特殊说明(出血、坏死、脱钙处理等);

临床病史:可提供疾病史、治疗史、家族史等;

检测项目:所检测的基因目录、覆盖范围和变异类型、检测平台名称、分析软件版本号等(建议选择国家药品监督管理局批准认可的产品)。

(2) 标本质控信息:

标本病理评估:FFPE 样本经苏木精-伊红染色后,评估样本所含肿瘤细胞比例,建议组织标本中肿瘤细胞比例达到 30% 以上,肿瘤细胞比例与基因突变检测率和检出的丰度值关系密切。

DNA 质量评估:DNA 的质量对检测结果的准确性有重要影响。需要从 DNA 纯度、DNA 浓度以及 DNA 片段化程度进行充分评估。

文库制备及质量评估:测序前需要对 DNA 样本进行文库制备。基于扩增子的方法和基于杂交捕获的方法是目前常用的文库制备方法。选择合适的文库制备试剂盒,需考虑所使用样本的类型、DNA 起始量、基因板数据量等因素。为使测序质量和产量达到最优,需要从 DNA 浓度及片段大小等方面对文库制备过程进行质控。

NGS 测序质量评估:构建好的文库将在高通量测序仪上进行上机测序,测序完成后需要对原始数据进行质控,再进行后续的生物信息分析。

(3) 检测结果证据等级:在文献综述基础上,建议将肿瘤体细胞基因变异根据证据等级分为 4 类:

I 类变异:明确临床意义的变异,A 级证据是由 FDA、国家药品监督管理局批准,或来自专业临床指南,B 级证据是由临床研究证实,且取得领域专家共识;

II 类变异:潜在临床意义的变异,C 级证据是由 FDA、国家药品监督管理局批准的不同肿瘤类型的疗法或试验性疗法、多项小型已发表研究达成的共识,D 级证据是临床前研究或少数病例报告,还未达成共识;

III 类变异:临床意义未明的变异,在一般或特定亚组数据库、泛癌种、肿瘤特异性变异数据库中未观察到显著的定位基因发生频率,还没有已发表的可靠的与癌症相关的证据;

IV 类变异:良性或可能良性变异,在一般或特定亚群数据库中观察到显著等位基因发生频率。目前尚无已发表的癌症相关性证据。

在 NGS 测序中,主要检测单核苷酸变异、插入缺失变异和基因融合等,参数调整后可分析基因拷贝数变异,根据相应变异结果,判读相应基因变异所表明的临床意义。

**专家意见 5:**临床医师在开展结直肠癌分子标志物检测时,应充分了解各检测方法的性能,推荐临床加强基因检测报告中样本类型、检测方法、突变类型等部分的关注和解读。推荐 NGS 在获得认证的平台和技术、严格的质控、规范的操作流程的基础上进行运用。

#### 四、总结

随着近年分子生物学在结直肠癌领域的研究不断深入,分子标志物在疾病诊断、指导治疗、预后分析等临床实践中起到了越来越重要的作用。加强对分子标志物机制、意义的认识,合理应用分子标志物在结直肠癌治疗中的指导作用,提高 NGS 等技术在结直肠癌分子标志物检测中的应用,是现阶段临床医生在临床实践中的必备技能,也是未来临床科研工作的重要方向。

## 《结直肠癌分子标志物临床检测中国专家共识》专家组

专家组组长:张苏展(浙江大学医学院附属第二医院)、袁瑛(浙江大学医学院附属第二医院)

专家组成员(按姓氏汉语拼音字母排序):蔡三军(复旦大学附属肿瘤医院)、程勇(重庆医科大学附属第一医院)、代恩勇(吉林大学中日联谊医院)、戴广海(解放军总医院)、邓艳红(中山大学附属第六医院)、丁克峰(浙江大学医学院附属第二医院)、顾艳宏(江苏省人民医院)、韩卫东(浙江大学医学院附属邵逸夫医院)、李健(北京大学肿瘤医院)、李军(浙江大学医学院附属第二医院)、李明(北京大学肿瘤医院)、李胜棉(河北医科大学第四医院)、李文斌(国家癌症中心/中国医学科学院肿瘤医院)、李心翔(复旦大学附属肿瘤医院)、林小燕(福建医科大学附属协和医院)、刘云鹏(中国医科大学附属第一医院)、陆德珉(浙江大学医学院附属第二医院)、邱萌(四川大学华西医院)、任黎(复旦大学附属中山医院)、孙凌宇(哈尔滨医科大学附属第四医院)、孙亚红(山东第一医科大学第三附属医院)、涂水平(上海交通大学医学院附属仁济医院)、王畅(吉林大学第一医院)、王峰(中山大学附属肿瘤医院)、王贵英(河北医科大学第四医院)、王琳(东南大学医学院附属南京同仁医院)、王琳(海南省人民医院)、王巍(佛山市第一人民医院)、熊斌(武汉大学中南医院)、许剑民(复旦大学附属中山医院)、许晶虹(浙江大学医学院附属第二医院)、徐瑞华(中山大学附属肿瘤医院)、徐焯(复旦大学附属肿瘤医院)、薛卫成(北京大学肿瘤医院)、杨春康(福建省肿瘤医院)、杨润祥(云南省肿瘤医院)、殷先利(湖南省肿瘤医院)、应杰儿(中国科学院大学附属肿瘤医院)、袁响林(华中科技大学同济医学院)、曾珊(中南大学湘雅医院)、张敬东(辽宁省肿瘤医院)、张俊(上海交通大学医学院附属瑞金医院)、张涛(重庆医科大学附属第一医院)、张卫(海军军医大学附属长海医院)、张艳桥(哈尔滨医科大学附属肿瘤医院)、章真(复旦大学附属肿瘤医院)、赵林(北京协和医院)、朱梁军(江苏省肿瘤医院)、朱远(中国科学院大学附属肿瘤医院)

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参 考 文 献

- [1] 郑荣寿,孙可欣,张思维,等. 2015年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2019, 41(1): 19-28. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2019.01.008.
- [2] Bronkhorst AJ, Ungerer V, Holdenrieder S. The emerging role of cell-free DNA as a molecular marker for cancer management [J]. *Biomol Detect Quantif*, 2019, 17: 100087. DOI: 10.1016/j.bdq.2019.100087.
- [3] Yeh YM, Lin PC, Lee CT, et al. Treatment monitoring of colorectal cancer by integrated analysis of plasma concentration and sequencing of circulating tumor DNA [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 150. DOI: 10.1186/s12943-020-01273-8.
- [4] Heidrich I, Aćkar L, Mossahebi Mohammadi P, et al. Liquid biopsies: potential and challenges [J]. *Int J Cancer*, 2021, 148(3): 528-545. DOI: 10.1002/ijc.33217.
- [5] Zhou J, Wang C, Lin G, et al. Serial circulating tumor DNA in predicting and monitoring the effect of neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with rectal cancer: a prospective multicenter study [J]. *Clin Cancer Res*, 2021, 27(1): 301-310. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-20-2299.
- [6] Unseld M, Belic J, Pierer K, et al. A higher ctDNA fraction decreases survival in regorafenib-treated metastatic colorectal cancer patients. Results from the regorafenib's liquid biopsy translational biomarker phase II pilot study [J]. *Int J Cancer*, 2021, 148(6): 1452-1461. DOI: 10.1002/ijc.33303.
- [7] Martini G, Dienstmann R, Ros J, et al. Molecular subtypes and the evolution of treatment management in metastatic colorectal cancer [J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2020, 12: 1758835920936089. DOI: 10.1177/1758835920936089.
- [8] Schirripa M, Cohen SA, Battaglin F, et al. Biomarker-driven and molecular targeted therapies for colorectal cancers [J]. *Semin Oncol*, 2018, 45(3): 124-132. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2017.06.003.
- [9] Wang Y, Loree JM, Yu C, et al. Distinct impacts of KRAS, NRAS and BRAF mutations on survival of patients with metastatic colorectal cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2018, Suppl 36(15): S3513. DOI: 10.1200/JCO.2018.36.15.supp3513.
- [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] Gastrointestinal Cancers Symposium 2015: New analysis from PEAK study: early, deep and sustained tumor shrinkage by panitumumab [J]. *Oncol Res Treat*, 2015, 38(5): 258-259. DOI: 10.1159/000430976.
- [12] Modest DP, Stintzing S, von Weikersthal LF, 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.
- [13] Sobrero A, Lenz HJ, Eng C, et al. Extended RAS analysis of the phase III EPIC trial: irinotecan + cetuximab versus irinotecan as second-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer [J]. *Oncologist*, 2020, DOI: 10.1002/onco.13591.
- [14] Benavides M, Díaz-Rubio E, Carrato A, et al. Tumour location and efficacy of first-line EGFR inhibitors in KRAS/RAS wild-type metastatic colorectal cancer: retrospective analyses of two phase II randomised Spanish TTD trials [J]. *ESMO Open*, 2019, 4(6): e000599. DOI: 10.1136/esmoopen-2019-000599.
- [15] Yoshino T, Arnold D, Taniguchi H, et al. Pan-Asian adapted ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer: a JSMO-ESMO initiative endorsed by CSCO, KACO, MOS, SSO and TOS [J]. *Ann Oncol*, 2018, 29(1): 44-70. DOI: 10.1093/annonc/mdx738.
- [16] 杨梦园,胡涵光,陈佳琦,等. BRAF突变晚期结直肠癌的治疗

- 进展[J].实用肿瘤杂志,2019,34(4):374-379. DOI:10.13267/j.cnki.syzlzz.2019.04.019.
- [17] National Comprehensive Cancer Network. Clinical Practice Guidelines in Oncology. Colon Cancer (NCCN Guidelines®) (2021 Version 1)[EB/OL]. (2020-03-03)[2020-12-25]. https://www.nccn.org.
- [18] National Comprehensive Cancer Network. Clinical Practice Guidelines in Oncology. Rectal Cancer (NCCN Guidelines®) (2021 Version 1)[EB/OL]. (2020-03-03)[2020-12-25]. https://www.nccn.org.
- [19] 中国临床肿瘤学会指南工作委员会. 结直肠癌诊疗指南 CSCO 2020 版[M]. 北京:人民卫生出版社, 2020.
- [20] Amin MB. AJCC Cancer Staging Manual (8th Edition) [M]. Chicago: Springer, 2017.
- [21] Guo TA, Wu YC, Tan C, et al. Clinicopathologic features and prognostic value of KRAS, NRAS and BRAF mutations and DNA mismatch repair status: a single-center retrospective study of 1, 834 Chinese patients with stage I-IV colorectal cancer [J]. Int J Cancer, 2019, 145(6):1625-1634. DOI:10.1002/ijc.32489.
- [22] George B, Taylor BW, Lasowski M, et al. Prognostic effect of specific RAS/BRAF mutations in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC) [J]. J Clin Oncol, 2020, 38(15):4050. DOI:10.1200/JCO.2020.38.15\_suppl.4050.
- [23] Le DT, Durham JN, Smith KN, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade [J]. Science, 2017, 357(6349):409-413. DOI:10.1126/science.aan6733.
- [24] Taieb J, Shi Q, Pederson L, et al. Prognosis of microsatellite instability and/or mismatch repair deficiency stage III colon cancer patients after disease recurrence following adjuvant treatment: results of an ACCENT pooled analysis of seven studies [J]. Ann Oncol, 2019, 30(9):1466-1471. DOI:10.1093/annonc/mdz208.
- [25] 袁瑛. 结直肠癌及其他相关实体瘤微卫星不稳定性检测中国专家共识 [J]. 实用肿瘤杂志, 2019, 34(5):381-389. DOI:10.13267/j.cnki.syzlzz.2019.05.001.
- [26] Overman MJ, McDermott R, Leach JL, et al. Nivolumab in patients with metastatic DNA mismatch repair - deficient or microsatellite instability - high colorectal cancer (CheckMate 142): an open - label, multicentre, phase 2 study [J]. Lancet Oncol, 2017, 18(9):1182-1191. DOI:10.1016/S1470-2045(17)30422-9.
- [27] Andre T, Shiu KK, Kim TW, et al. Pembrolizumab versus chemotherapy for microsatellite instability-high/mismatch repair deficient metastatic colorectal cancer: the phase 3 KEYNOTE - 177 study [J]. J Clin Oncol, 2020, 38 Suppl 18; abstr LBA4. DOI:10.1200/JCO.2020.38.18\_suppl.LBA4.
- [28] Valtorta E, Martino C, Sartore-Bianchi A, et al. Assessment of a HER2 scoring system for colorectal cancer: results from a validation study [J]. Mod Pathol, 2015, 28(11):1481-1491. DOI:10.1038/modpathol.2015.98.
- [29] Liao X, Lochhead P, Nishihara R, et al. Aspirin use, tumor PIK3CA mutation, and colorectal-cancer survival [J]. N Engl J Med, 2012, 367(17):1596-1606. DOI:10.1056/NEJMoa1207756.
- [30] Mosele F, Remon J, Mateo J, et al. Recommendations for the use of next - generation sequencing (NGS) for patients with metastatic cancers: a report from the ESMO Precision Medicine Working Group [J]. Ann Oncol, 2020, 31(11):1491-1505. DOI:10.1016/j.annonc.2020.07.014.
- [31] Kyrochristos ID, Roukos DH. Comprehensive intra - individual genomic and transcriptional heterogeneity: evidence - based colorectal cancer precision medicine [J]. Cancer Treat Rev, 2019, 80:101894. DOI:10.1016/j.ctrv.2019.101894.
- [32] Del Vecchio F, Mastroiaco V, Di Marco A, et al. Next - generation sequencing: recent applications to the analysis of colorectal cancer [J]. J Transl Med, 2017, 15(1):246. DOI:10.1186/s12967-017-1353-y.
- [33] Kastrisiou M, Zarkavelis G, Pentheroudakis G, et al. Clinical application of next - generation sequencing as a liquid biopsy technique in advanced colorectal cancer: a trick or a treat? [J]. Cancers (Basel), 2019, 11(10):1573. DOI:10.3390/cancers11101573.

(收稿日期:2020-12-25)

(本文编辑:卜建红)

**本文引用格式**

中国临床肿瘤学会(CSCO)结直肠癌专家委员会. 结直肠癌分子标志物临床检测中国专家共识[J]. 中华胃肠外科杂志, 2021, 24(3): 191-197. DOI:10.3760/cma.j.cn.441530-20201225-00679.