

肿瘤内科学专题

· 临床研究 ·

错配修复缺陷对贝伐珠单抗治疗转移性结直肠癌的预后影响*

凌家瑜, 李唯伟, 张剑威, 蔡月, 胡华斌, 黄美近, 康亮, 任东林, 邓艳红[△]

510655 广州, 中山大学附属第六医院 肿瘤内科(凌家瑜、李唯伟、张剑威、蔡月、胡华斌、邓艳红), 结直肠外科(黄美近、康亮、任东林), 广东省胃肠病学研究所(凌家瑜、李唯伟、张剑威、蔡月、胡华斌、黄美近、康亮、任东林、邓艳红); 510655 广州, 广东省结直肠盆底疾病研究重点实验室(凌家瑜、李唯伟、张剑威、蔡月、胡华斌、黄美近、康亮、任东林、邓艳红)

[摘要] 目的: 探讨错配修复缺陷对贝伐珠单抗治疗转移性结直肠癌的预后影响。方法: 回顾性分析 2012 年 2 月至 2015 年 2 月在中山大学附属第六医院应用贝伐珠单抗联合化疗和单纯化疗治疗转移性结直肠癌的患者资料, 包括临床病理特征和随访信息, 应用 Kaplan-Meier 生存曲线研究总生存时间(overall survival, OS)和临床病理特征的关系, 通过多因素 COX 模型评估对贝伐珠单抗治疗转移性结直肠癌的预后影响因子。结果: 纳入 163 例转移性结直肠癌患者, 贝伐珠单抗联合化疗组 95 例, 单纯化疗组 68 例。队列中 123 例患者检测错配修复(mismatch repair, MMR)状态, 其中 13 例伴有错配修复缺陷(MMR-deficient, dMMR)。贝伐珠单抗联合化疗组, dMMR 患者和无错配修复缺陷(mismatch repair-proficient, pMMR)患者的中位 OS 分别为 41.0 月和 24.9 月($HR = 0.12, 95\% CI: 0.017 \sim 0.89, P = 0.001$), 而单纯化疗组则出现相反的趋势, dMMR 患者和 pMMR 患者中位 OS 分别为 8.8 月和 19.7 月($HR = 11.26, 95\% CI: 2.7 \sim 48.0, P < 0.001$)。多因素 COX 模型纳入年龄、CEA 值、KRAS 基因、MMR 状态和治疗分组, MMR 状态 * 治疗分组交互项是本队列晚期结直肠癌患者 OS 的独立影响因素($P_{interaction} = 0.037$)。结论: 与单纯化疗相比, dMMR 的患者应用贝伐珠单抗联合化疗治疗转移性结直肠癌的患者总生存时间延长。

[关键词] 贝伐珠单抗; 转移性结直肠癌; 总生存时间; 错配修复

[中图分类号] R735.3; R730.53 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1674-0904.2019.09.009

引文格式: Ling JY, Li WW, Zhang JW, et al. Effect of defective mismatch repair status on prognosis of patients with metastatic colorectal cancer treated with bevacizumab-based therapy [J]. J Cancer Control Treat, 2019, 32 (9): 807-815. [凌家瑜, 李唯伟, 张剑威, 等. 错配修复缺陷对贝伐珠单抗治疗转移性结直肠癌的预后影响[J]. 肿瘤预防与治疗, 2019, 32 (9): 807-815.]

Effect of Defective Mismatch Repair Status on Prognosis of Patients with Metastatic Colorectal Cancer Treated with Bevacizumab-Based Therapy

Ling Jiayu, Li Weiwei, Zhang Jianwei, Cai Yue, Hu Huabin, Huang Meijin, Kang Liang, Ren Donglin, Deng Yanhong

Department of Medical Oncology, The Sixth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510655, Guangdong, China (Ling Jiayu, Li Weiwei, Zhang Jianwei, Cai Yue, Hu Huabin, Deng Yanhong); Department of Colorectal Surgery, The Sixth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510655, Guangdong, China (Huang Meijin, Kang Liang, Ren Donglin); Guangdong Research Institute of Gastroenterology, The Sixth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510655, Guangdong, China (Ling Jiayu, Li Weiwei, Zhang Jianwei, Cai Yue, Hu Huabin, Huang Meijin, Kang Liang, Ren Donglin, Deng Yanhong); Key Laboratory of Colorectal Disease and Pelvic Floor Disorder Research in Guangdong Province, Guangzhou 510655, Guangdong, China (Ling Jiayu, Li Weiwei, Zhang Jianwei, Cai Yue, Hu Huabin, Huang Meijin, Kang Liang, Ren Donglin, Deng Yanhong)

[收稿日期] 2019-04-23 **[修回日期]** 2019-08-22

[基金项目] * 广州市科技计划(编号:201803010073)

[通讯作者] [△] 邓艳红, E-mail: lingjiayu@mail.sysu.edu.cn

Guangdong, China (Ling Jiayu, Li Weiwei, Zhang Jianwei, Cai Yue, Hu Huabin, Huang Meijin, Kang Liang, Ren Donglin, Deng Yanhong)

Corresponding author: Deng Yanhong, E-mail: lingjiay@mail.sysu.edu.cn

This study was supported by Guangzhou Science and Technology Plan (NO. 201803010073).

[Abstract] **Objective:** This study aims to identify effect of defective mismatch repair (MMR) status on prognosis of patients with metastatic colorectal cancer treated with bevacizumab. **Methods:** Clinicopathological features and follow-up information of patients with mCRC treated with bevacizumab combined with chemotherapy (Bev-group) or chemotherapy only (Chemo-group) in the Sixth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University from February 2012 to February 2015 were retrospectively analyzed. The relationship between overall survival (OS) and clinicopathological features was studied by using Kaplan-Meier survival curve. The prognostic factors of patients with mCRC treated by bevacizumab was evaluated by multivariate COX model. **Results:** A cohort of 163 patients (95 in Bev-group and 68 in Chemo-group) were enrolled in this study. Out of 123 patients evaluated for MMR, 13 patients showed MMR-deficient (dMMR). In Bev-group, median OS was 41.0 months and 24.9 months for patients with dMMR and MMR-proficient ($HR = 0.12$, $95\% CI: 0.017 \sim 0.89$, $P = 0.001$) respectively, while in Chemo-group the median OS was 8.8 months and 19.7 months ($HR = 11.26$, $95\% CI: 2.7 \sim 48.0$, $P < 0.001$) respectively. Multivariate COX model included age, carcinoembryonic antigen, KRAS gene, MMR status and grouping strategy. MMR status * grouping strategy interactive variable was an independent influencing factor of OS in patients with advanced colorectal cancer in this cohort ($P_{interaction} = 0.037$). **Conclusion:** Patients with dMMR treated with bevacizumab plus chemotherapy enjoyed better OS than those treated with chemotherapy alone.

[Key words] Bevacizumab; Metastatic colorectal cancer; Overall survival; Mismatch repair

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是全球发病率第 3 的癌症, 大约 40% 的患者会发展为转移性结直肠癌^[1]。转移性结直肠癌 (metastatic colorectal cancer, mCRC) 的标准治疗是化疗联合靶向血管生成^[2]或表皮生长因子受体的治疗^[3]。尽管有多种方案治疗转移性结直肠癌, 但转移性结直肠癌患者的 5 年生存率仍小于 15%^[4]。靶向药物的疗效预测因子, 一直是转移性结直肠癌研究的热点, 精准治疗可增加治疗效益, 减轻经济负担。RAS 基因突变和 BRAFV600E 基因突变, 预示着抗表皮生长因子受体单克隆抗体耐药。贝伐珠单抗的几种候选生物标志物, 包括 VEGF 亚型 (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C 和 VEGF-D) 和神经纤毛蛋白-1 (VEGF 的共同受体), 这些标记在小型探索中取得了可喜的成果, 但在较大的独立队列中的验证失败了, 暂时无指导治疗效果预测的贝伐珠单抗标志物^[5]。

DNA 错配修复 (mismatch repair, MMR) 通过纠正 DNA 复制错误来维持基因组的稳定性。林奇综合征患者 MMR 基因的胚系突变占结肠肿瘤的 2%~4%^[6], 而在结直肠癌的患者当中, 有 19% 的患者发生基因的自然修饰 (如甲基化)^[7]。这些表现可导致 MMR 蛋白缺乏 (mismatch repair-deficient, dMMR) 和微卫星不稳定性 (microsatellite instability, MSI)。dMMR 是判断 II~III 期 CRC 预后并决定 II 期结肠癌患者是否接受辅助化疗的重要生物标志物^[8]。dMMR 转移性结直肠癌数量少且类型复杂, 化疗不敏感, 预后较 MMR 无缺失 (mismatch repair-

proficient, pMMR) 的患者差^[9], dMMR 也是 PD-1 单抗治疗 mCRC 有效的重要预测因子^[10]。NSABP-C08^[11] 研究虽然没有达到主要研究终点, 但其探索性研究结果提示, 在 II~III 期 CRC 辅助治疗中, dMMR 亚组应用贝伐珠单抗联合化疗比单纯化疗显著延长 OS ($P_{interaction} = 0.02$), 揭示了贝伐珠单抗疗效和 dMMR 可能关联。

这些数据为贝伐珠单抗治疗疗效标志物探索提供了新的方向, 然而, dMMR 转移性结直肠癌应用贝伐珠单抗联合化疗预后的关系, 尚不清楚。在本研究中, 我们回顾性地分析了接受贝伐珠单抗联合化疗和单纯化疗的 mCRC 患者的 dMMR 等临床病理特征与预后的关系。

1 研究对象与方法

1.1 研究对象

本研究回顾性分析了 2012 年 2 月至 2015 年 2 月在中山大学附属第六医院肿瘤内科进行全身治疗的 mCRC 患者, 包括连续接受两个周期以上的贝伐珠单抗联合化疗或单独化疗的患者。排除接受西妥昔单抗治疗的 mCRC 患者。本研究经院伦理委员会审核通过 (伦理编号: 2018ZSLYEC-044)。

1.2 研究方法

根据患者接受的治疗方案进行分组: 贝伐珠单抗联合化疗为 bev 组, 单纯化疗为化疗组。贝伐珠单抗联合含奥沙利铂方案包括 mFOLFOX6 q14d 或 XELOX q21d 方案, 并根据化疗计划加贝伐珠单抗

5~7.5mg/kg。贝伐珠单抗联合含伊立替康方案包括 FOLFIRI q14d 或 mFOLFIRI d1, d8, q21d 方案加上贝伐珠单抗 5~7.5mg/kg q14d。贝伐珠单抗联合的三药方案是 FOLFOXIRI q14d, 贝伐珠单抗联合氟尿嘧啶单药治疗是 5-氟尿嘧啶持续灌注、卡培他滨或 S-1。

每 2~3 个月进行一次胸腹 CT 扫描和血清癌胚抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) 检测。主要终点为总生存期 (overall survival, OS), 定义为首次诊断 mCRC 到死亡或最后一次随访之间的时间。末次随访时存活的患者, 定义为删失病例。本研究截止日期是 2018 年 3 月。

1.3 MMR 免疫组化 (IHC) 分析

队列中 163 例患者中 123 例可通过 MMR 蛋白表达进行评价, 其余 40 例因标本不足或经济原因不能检测。治疗前用免疫组化法检测肿瘤组织中 MMR 蛋白的表达。dMMR 状态定义为肿瘤 MLH1、MSH2、MSH6 或 PMS2 蛋白表达缺失。pMMR 状态定义为肿瘤 MLH1、MSH2、MSH6、PMS2 蛋白正常表达。手术切除或活检收集肿瘤标本, 10% 中性磷酸缓冲福尔马林固定 24~48 小时, 常规脱水、固定、石蜡包埋, 于病理科保存。免疫组化常规检测如下四种 MMR 蛋白 (MLH1, PMS2, MSH2 以及 MSH6)。5 微米肿瘤组织切片孵于 MLH1 (克隆 ES05; ZSGB-BIO, 北京, 中国), MSH2 (克隆 RED2; ZSGB-BIO), MSH6 (克隆 EP49; ZSGB-BIO) 和 PMS2 (克隆 EP51; ZSGB-BIO) 兔单克隆抗体中。随后, 将这些切片在二甲苯中脱蜡, 不同浓度梯度酒精和蒸馏水中水化, 然后在柠檬酸盐溶液 PH 6.0 (MLH1、PMS2 和 MSH2) 或 EDTA PH 9.0 (MSH6) 中热修复抗原。采用自动检测器 (Ventana Benchmark XT Autostainer, Tucson, AZ, USA)。用浸润淋巴细胞为阳性对照, 肿瘤细胞内的核染色则为蛋白正常表达。和存在阳性标记的非肿瘤组织相比, 肿瘤细胞内核染色完全缺失为蛋白表达阴性。对免疫反应性 < 10% 的肿瘤细胞进行重复检查, 如果检查结果得到证实, 则判定为不明确。那些在肿瘤和非肿瘤组织中都缺乏任何表达的病例进行了相似的条件 IHC 重复实验。根据文献判读免疫组化染色的结果^[12]: 免疫阳性反应率: 0 分 (非阳性肿瘤细胞)、1 分 ($\leq 10\%$ 阳性细胞)、2 分 (11%~50% 阳性细胞)、3 分 (51%~80% 阳性细胞)、4 分 (>80% 阳性细胞)。强度: 0 (无染色)、1 (弱染色, 淡黄色)、2 (中度染色, 棕黄色)、3 (强染色, 棕色)。将标本分为两组, 按乘法评分:

0~1 分表示蛋白表达阴性, ≥ 2 分表示蛋白表达阳性。dMMR 状态定义为任何 MLH1/MSH2/MSH6/PMS2 蛋白的阴性表达, 而 pMMR 状态表示蛋白^[13] 的阳性表达。整个组织切片由两名不了解患者临床特征的病理学家独立评分, 不一致的病例由另一名病理学家进行复查以达成一致意见。

1.4 KRAS 基因突变检测

对队列 163 例中的 141 例患者进行 MMR 蛋白表达评估, 其余 22 例患者因标本不足或经济原因未检测。用常规处理的苏木精-伊红 (HE) 切片, 以确定足够肿瘤组织并选择肿瘤含量为 >30% 的区域。10 μ m 组织部分被切片和部分转移到 1.5 毫升埃普多夫管以使用 Hipure FFPE DNA 试剂盒进行 DNA 提取 (Thermo Scientific, Niederelbert, Germany)。用 NanoDrop ND-2000 分光光度计 (Thermo Scientific, Niederelbert, Germany) 对分离的 DNA 进行定性和定量分析。50~100ng/ μ L DNA 用于后续分析。检测 KRAS 外显子 2 密码子 12 和 13、外显子 3 密码子 59 和 61、外显子 4 密码子 117 和 146 的突变。在 ABI 9700 PCR 系统上进行 PCR 扩增。20 μ L 反应体系包含 50~100ng DNA 模板和 500 mM 引物, 扩增程序是: 初始变性 98 $^{\circ}$ C 5min, 随后是 95 $^{\circ}$ C 25s, 58 $^{\circ}$ C 25s, 72 $^{\circ}$ C 25s, 共 45 个循环; 最后一个扩增 72 $^{\circ}$ C 10min。BigDye Terminator v3.1 测序标准试剂盒 (Thermo Fisher Scientific, USA) 和 ABI 棱镜 3500 dx 基因分析仪 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 测序。

1.5 统计分析

数据表示为频率 (百分比) 或平均值和中位数 (范围)。采用卡方检验或 Fisher's 精确检验对所检查变量的分布差异进行评估。中位随访时间和 95% 置信区间 (confidence interval, CI) 采用逆向 Kaplan-Meier 法计算。生存曲线采用 Kaplan-Meier 法估计, log-rank 检验比较。根据肿瘤 MMR 状况和 CEA 水平比较患者 OS 曲线。建立单变量和多变量 Cox 比例危险回归模型, 估计危险比 (hazard ratio, HR), 计算 95% CI 和子组相互作用 P 值。另一方面, 多变量 Cox 分析包括单变量 Cox P 值 < 0.1 的临床变量。双侧 P 值 < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 患者的临床病理特征

163 例 mCRC 患者中, 95 例接受贝伐珠单抗联合化疗 (58.3%), 68 例仅接受化疗 (41.7%)。本研

究的贝伐珠单抗应用与否,并非随机对照分组,而是根据患者的肿瘤特征、基因状态、经济承受能力而进行的选择。两组的临床病理特征如表 1,使用贝伐珠单抗患者的特点包括,更多的同时性转移(74.7% vs 52.9%, $P = 0.004$)、更多保留原发灶(32.6% vs 16.2%, $P = 0.018$)、更多的 CA19-9 升高(53.2% vs 35.4%, $P = 0.027$)和更多的低分化(G3, 34.1% vs 15.4% $P = 1.016$)。163 名患者中,有 123 名进行了 MMR 蛋白的检测,dMMR 的患者比例在两组

均衡(10.7% vs 10.4%, $P = 0.97$) (表 1)。本研究中,dMMR 肿瘤与年龄无关。pMMR 组中位年龄 57 岁(20 ~ 86 岁),dMMR 组中位年龄 49 岁(31 ~ 68 岁)。pMMR 组 50 岁以下患者占 38.2%,dMMR 组占 46.2% ($P = 0.58$)。然而,dMMR 肿瘤与原发灶部位相关,dMMR 比 pMMR 的右半结肠癌比例更多(46.2% vs 19.1%, $P = 0.026$)。13 名 dMMR 患者的 MMR 表达情况见表 2。

表 1 不同治疗组的临床病理特征($n = 163$)

Table 1. The Clinicopathological Features Stratified by Treatment Group ($n = 163$)

Variable	All patients ($n = 163$)		Bev-group ($n = 95$)		Chemo-group ($n = 68$)		P
	n	%	n	%	n	%	
	Age (years)	163					
<65	120	73.6%	72	75.8%	48	70.6%	
≥65	43	26.4%	23	29.4%	20	29.4%	
Gender	163						0.781
Male	101	62.0%	58	61.1%	43	63.2%	
Female	62	38.0%	37	38.9%	25	36.8%	
Colorectal cancer location	163						0.594
Left-sided	126	77.3%	72	75.8%	54	79.4%	
Right-sided	37	22.7%	23	24.2%	14	20.6%	
Metastases presentation	163						0.004
Synchronous	107	65.6%	71	74.7%	36	52.9%	
Metachronous	56	34.4%	24	25.3%	32	47.1%	
Primary tumor resection	163						0.018
No	42	25.8%	31	32.6%	11	16.2%	
Yes	121	74.2%	64	67.4%	57	83.8%	
CEA	163						0.168
≤10	76	46.6%	40	42.1%	36	52.9%	
>10	87	53.4%	55	57.9%	32	47.1%	
CA19-9	159						0.027
Normal	86	54.1%	44	46.8%	42	64.6%	
Evaluated	73	45.9%	50	53.2%	23	35.4%	
Primary tumor grade	140						0.016
G1,G2	102	72.9%	58	65.9%	44	84.6%	
G3	38	27.1%	30	34.1%	8	15.4%	
KRAS	141						0.940
Wild-type	83	58.9%	52	59.1%	31	58.5%	
Mutated	58	41.1%	36	40.9%	22	41.5%	
MMR status	123						0.973
pMMR	110	89.4%	67	89.3%	43	89.6%	
dMMR	13	10.6%	8	10.7%	5	10.4%	

Bev-group: Bevacizumab plus chemotherapy; Chemo-group: Chemotherapy alone; CEA: Carcinoembryonic antigen; CA19-9: Carbohydrate antigen 199; MMR: Mismatch repair; pMMR: Proficient MMR; dMMR: Deficient MMR.

χ^2 test was used to calculate P values for an association between the clinical variables and the addition of bevacizumab to chemotherapy. Significant associations were found in metastases presentation, primary tumor resection, CA19-9 level and primary tumor grading. Data of some parameters are only available for part of patients, such as CA19-9 (159/163), primary tumor grade (140/163), KRAS (141/163) and MMR status (123/163).

表 2 dMMR 肿瘤 MMR 蛋白表达情况
Table 2. MMR Protein Expression in dMMR

Number of Patients	MLH-1	MSH-2	MSH-6	PMS-2
1	-	+	+	-
2	-	+	+	-
3	+	+	-	+
4	-	+	+	-
5	-	+	+	+
6	+	-	-	+
7	-	+	+	-
8	-	+	+	-
9	+	-	-	+
10	+	-	-	+
11	+	+	+	-
12	-	+	+	-
13	-	+	+	-

MMR: Mismatch repair; dMMR: deficient MMR; -: Negative protein expression; +: Positive protein expression

2.2 预后分析

本研究患者中位随访 32 月 (22.4 ~ 41.7 月), 101 例患者死亡。本队列患者的中位 OS 24.6 月 (95% CI 21.2 ~ 27.9 月)。贝伐珠单抗联合化疗组和单纯化疗组的中位 OS 分别为 24.2 月 (95% CI 21.1 ~ 26.8 月) 和 20.0 个月 (95% CI 21.1 ~ 26.8 月) ($HR = 0.59, 95\% CI: 0.40 \sim 0.89, P = 0.01$) (图 1)。在贝伐珠单抗联合化疗组中, dMMR 患者中位 OS 为 41.0 月, 而 pMMR 患者中位 OS 为 24.9 个月 ($P = 0.001$); 而单纯化疗组中, dMMR 患者中位 OS 为 8.8 个月, pMMR 患者中位 OS 为 19.7 个月 ($P < 0.001$) (图 2)。

影响本队列晚期结直肠癌患者 OS 的单因素和

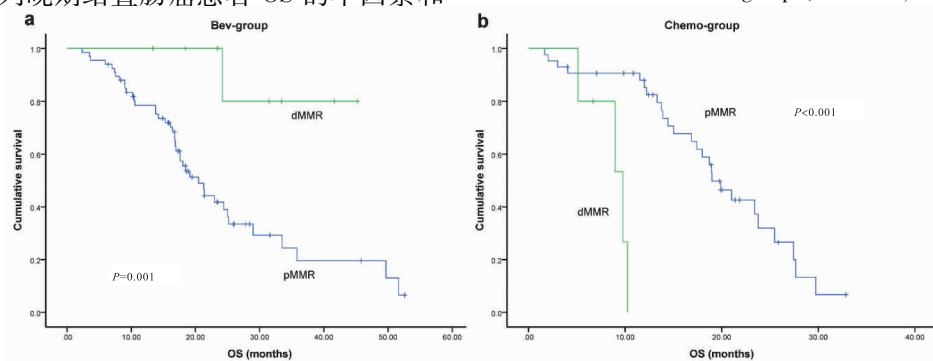


图 2 不同治疗方案和 MMR 状态的 mCRC 患者的 Kaplan-Meier 生存曲线
Figure 2. Kaplan-Meier Survival Curves of Metastatic Colorectal Cancer Patients Based on Different Treatments and MMR Status

Panel a showed that the median overall survival was 41.0 months for patients with deficient mismatch repair as compared to 24.9 months for patients with proficient mismatch repair ($P = 0.001$) in the Bev-group. Panel b showed that the median overall survival was 8.8 months for patients with deficient mismatch repair as compared to 19.7 months for patients with proficient mismatch repair ($P < 0.001$) in the Chemo-group. Effects of different treatments varied significantly according to mismatch repair status (test for interaction, $P = 0.037$).

多因素分析: 贝伐珠单抗联合化疗组的单因素分析结果显示, 治疗前 CEA < 10ng/mL、病理分级低分化 (G1,2)、dMMR 与患者的 OS 延长有关, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 化疗组的单因素分析结果显示, 治疗前 CEA < 10ng/mL、KRAS 野生型、pMMR 状态与患者的 OS 延长有关, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 3)。然而, MMR 状态对两组患者的预后影响是相反的: 贝伐珠单抗联合化疗组预后良好 ($HR, 0.12; 95\% CI: 0.017 \sim 0.89, P = 0.038$), 化疗组相反预后不好 ($HR, 11.26; 95\% CI: 2.70 \sim 48.0; P = 0.001$) (表 3)。如果把贝伐珠单抗联合化疗组和化疗组的数据合并, 即全队列数据行单变量分析, 结果显示, dMMR 状态与 OS 无关, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

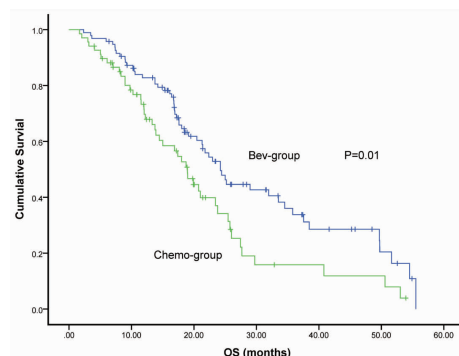


图 1 不同治疗方案 mCRC 患者的 Kaplan-Meier 生存曲线
Figure 1. Kaplan-Meier Survival Curves of Metastatic Colorectal Cancer Patients Based on Different Treatments
According to palliative regimens, metastatic colorectal cancer patients were divided into two groups: Bev-group and Chemo-group. Patients in the Bev-group had a prolonged overall survival than those in the Chemo-group ($P = 0.01$).

表 3 不同的治疗组 OS 预后因素单因素分析 ($n=163$)Table 3. Univariate Analysis of Prognostic Factors for OS in Different Treatment Groups ($n=163$)

Variables	Bev-Group			Chemo-Group		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
Age (year)						0.613
<65	0.672	0.353 – 1.291	0.228	0.852	0.452 – 1.601	
≥65		Referent			Referent	
Gender						0.772
Male	1.121	0.656 – 1.933	0.680	0.934	0.493 – 1.673	
Female		Referent			Referent	
CRC location						0.661
Left-sided	0.744	0.402 – 1.370	0.340	0.847	0.426 – 1.732	
Right-sided		Referent			Referent	
Metastases Presentation						0.364
Synchronous		Referent			Referent	
Metachronous	1.267	0.710 – 2.257	0.420	1.320	0.734 – 2.409	
Primary tumor resection						
No		Referent			Referent	0.210
Yes	0.600	0.342 – 1.048	0.070	0.654	0.293 – 1.412	
CEA						0.027
≤10		Referent	0.001		Referent	
>10	2.827	1.560 – 5.149		2.050	1.090 – 3.897	
CA19-9						0.120
Normal		Referent	0.050		Referent	
Evaluated	1.744	1.003 – 3.087		1.670	0.871 – 3.211	
Primary tumor grade						0.940
G1, G2			0.021		Referent	
G3	2.000	1.114 – 3.602		0.901	0.315 – 2.574	
KRAS						0.024
Wild-type	0.736	0.425 – 1.309	0.290	0.403	0.202 – 0.898	
Mutated					Referent	
MMR status						0.001
pMMR			0.038		Referent	
dMMR	0.127	0.021 – 0.891		11.260	2.702 – 46.983	

OS: Overall survival; HR: Hazard ratio; CI: Confidence interval; Bev-group: Bevacizumab plus chemotherapy; Chemo-group: Chemotherapy alone; CEA: Carcinoembryonic antigen; CA19-9: Carbohydrate antigen 199; MMR: Mismatch repair; pMMR: Proficient MMR; dMMR: Deficient MMR.

Univariate analysis for the cohort of Bev-group showed that CEA <10ng/mL, intermediate or good differentiation (G1, 2), and dMMR were associated with OS benefit ($P < 0.05$). The univariate analysis for cohort of Chemo-group showed that CEA <10ng/mL, KRAS wild type and pMMR status were related to OS benefit ($P < 0.05$).

将年龄、CEA 水平、KRAS 状态、MMR 状态和治疗分组(是否联合贝伐珠单抗),纳入 Cox 比例风险回归模型进行多因素分析,其中 MMR 状态和治疗分组交互组合,结果显示 MMR 状态和治疗分组交

互组合是本队列晚期结直肠癌患者 OS 的独立影响因素($P_{interaction} = 0.037$),而年龄、CEA 水平、KRAS 状态不是晚期结直肠癌患者 OS 的独立影响因素(P 均 >0.05)(表 4)。

表 4 结直肠癌患者 OS 预后因素的多因素分析 (n=163)
Table 4. Multivariate Analysis of Prognostic Factors for OS in Colorectal Cancer Patients (n=163)

Variables	All Patients		
	HR	95% CI	P
Age (years)			0.421
<65	0.805	0.475 - 1.366	
≥65	1	Referent	
CEA			0.119
≤10	1	Referent	
>10	1.484	0.903 - 2.44	
KRAS			0.296
Wild-type	1.306	0.791 - 2.155	
Mutated	1	Referent	
MMR status * grouping strategy	0.121	0.016 - 0.878	0.037

OS: Overall survival; CEA: Carcinoembryonic antigen; MMR: Mismatch repair.

Age, CEA level, KRAS status, MMR status, and grouping strategy (whether combined with bevacizumab or not) were included in the Cox proportional hazards regression model for multivariate analysis, in which MMR status and grouping strategy were interactively combined, and the results showed MMR * grouping strategy interaction was an independent influencing factor for OS in patients with advanced colorectal cancer ($P_{interaction} = 0.037$).

3 讨论

最近 10 到 15 年,转移性结直肠癌的研究获得不少进展,从原来氟尿嘧啶时代的中位 OS 11 ~ 12 月延长到现在的中位 OS 接近 3 年^[14],这些进步就包括了抗血管生成药物—贝伐珠单抗的应用。贝伐珠单抗联合化疗方案是国际指南和中国共识普遍推荐的一种晚期结直肠癌标准治疗方案^[15-16]。不少研究探索贝伐珠单抗治疗转移性结直肠癌的优势人群^[17],然而,暂时没有任何标志物得到充分的验证而应用于临床。本研究首次报道,dMMR 晚期结直肠癌患者贝伐珠单抗联合化疗的方案比单纯化疗延长 OS。

林奇综合征的肠癌或 15% ~ 20% 的散发的肠癌可发现 MMR 基因突变或甲基化^[18],dMMR 结直肠癌的遗传特征是大量的 DNA 复制错误和高水平的 DNA 微卫星不稳定(microsatellite instability high, MSI-H)^[19],微卫星不稳定是指由于重复单元的插入或缺失所引起的短重复 DNA 序列的扩增或收缩。接受手术的 I ~ III 期的结直肠癌,无论是否应用 FOLFOX 辅助化疗,dMMR 的患者都比 pMMR 的预

后好^[8,20]。dMMR 对早期肠癌的预后影响的具体机制不详,但该分子特点被纳入第 7 版和第 8 版的 AJCC 分期系统中^[21-22]。dMMR 在晚期结直肠癌中的比例很低(3.5%)^[23],有研究提示,dMMR 的转移性结直肠癌预后不良^[13],同时,dMMR 的转移性结直肠癌可从免疫检查点抑制剂的治疗中获益^[24]。

本研究结果显示,贝伐珠单抗联合化疗明显延长 mCRC 患者的 OS($HR = 0.59; P = 0.01$)。贝伐珠单抗联合化疗组 dMMR 与 OS 呈正相关($HR = 0.12; P = 0.038$),而单纯化疗组不相关($HR = 11.26; P = 0.001$)。当整个队列未按治疗进行分析时,dMMR 无预测价值。交互分析显示 MMR 状态与贝伐珠单抗联合化疗的生存延长相关,经年龄、CEA 水平、KRAS 基因状态调整后的进一步多变量分析($P_{interaction} = 0.037$)更加证实了这点。我们的数据表明 dMMR 的 mCRC 患者应用贝伐珠单抗联合化疗比单纯化疗的预后更好。虽然在 CRCs 患者中已经研究了 MMR 状态在贝伐珠单抗联合化疗中的预测价值,但尚未得到证实。NSABP C-08 报道,mFolfox6 联合贝伐珠单抗对比 mFolfox6,dMMR 肿瘤的患者显示出统计学上显著的 OS 获益。CALGB/SWOG 80405 是一项随机 III 期试验,在接受化疗加贝伐单抗和/或西妥昔单抗治疗的一线转移性结直肠癌患者中,总体生存率(OS)无统计学差异。近期该研究者回顾性分析了不同的分子特点对预后的影响,结果发现在 MSI-H 的 CRC 患者中(52/827 例),接受贝伐单抗治疗的中位 OS 比接受西妥昔单抗治疗的患者长(30.0 个月 vs 11.9 个月, $P < 0.001$)^[25]。

有研究证明,转移性结直肠癌一线治疗,贝伐珠单抗联合化疗治疗 MSI-H 肿瘤中位总生存时间比对照组显著延长^[25]。CALGB/SWOG 80405 是一项随机 III 期试验,在接受化疗加贝伐单抗和/或西妥昔单抗治疗的一线转移性结直肠癌患者中,OS 无统计学差异。该临床试验队列的基因分析研究中,dMMR 在整个队列的多因素分析当中没有预后价值,但是把 dMMR 的患者放在不同的治疗分组中,贝伐单抗联合化疗或者西妥昔单抗联合化疗,前者治疗组生存明显优于后者(30.0 月 vs 11.9 月),而且 pMMR 的患者在两个治疗组没有此差别。该研究假设了可能的机制,贝伐单抗诱导的血管正常化与免疫刺激所致的抗肿瘤效应相关,尤其是 Th1 淋巴细胞浸润和活性的免疫刺激途径,当微环境浸润了活化的 T 细胞,血管正常化可能增强该环境的抗肿瘤效应。然而,该研究的对照组为西妥昔单抗联

合化疗,众所周知,dMMR 结直肠癌大部分为甲基化所致的基因沉默,只有很小部分为 MMR 突变而丢失功能,而 dMMR 肠癌的高甲基化导致 EGFR 配体的低表达,应用 EGFR 抑制剂效果不佳^[26]。

另外一个研究结果显示,早期 CRC 患者术后进行辅助化疗,dMMR 患者接受贝伐珠单抗联合化疗的 OS 长于单纯化疗^[11]。NSABP C-08 旨在探索贝伐珠单抗联合 FOLFOX 方案在 II ~ III 期结直肠癌的患者辅助化疗中是否优于单纯的 FOLFOX 方案,该研究以阴性的结果告终,但后期加做 MMR 蛋白的免疫组化重新分析,OS 分析时发现 dMMR 与贝伐珠单抗的交互效应 P 值有显著性。该研究结果为贝伐珠单抗对 dMMR 肠癌有效提供更直接的证据,而在 pMMR 患者应用贝伐珠单抗联合化疗对比单纯化疗进行辅助治疗,OS 并无显著差别^[27]。

dMMR 的 mCRC 应用贝伐珠单抗疗效更好的机制,除了 CALGB/SWOG 80405 队列的基因分析研究的血管正常化假说以外,我们认为还可能存在其它机制。dMMR 诱导的微卫星不稳定性使肿瘤容易发生体细胞突变,dMMR 肿瘤突变负荷相当于 pMMR 肿瘤的 10 ~ 100 倍^[9]。肿瘤细胞突变会产生结构与正常抗原不同的新抗原,新抗原令肿瘤细胞更易于被免疫系统识别,因此肿瘤的存活有赖于微环境的免疫抑制^[9]。既往研究表明 VEGF-A 通过抑制 DC 细胞成熟和增强 T 细胞应答活性,下调微环境的免疫应答^[28]。抗血管生成药物贝伐珠单抗通过阻断 VEGF-A 破坏肿瘤微环境的免疫抑制,使免疫系统能够识别新的抗原并破坏肿瘤^[29]。

本研究有其局限性。首先,本研究为单中心的回顾性分析,贝伐珠单抗的选择依据,除了患者和肿瘤的特点以外,更重要的是经济原因,队列所在年代贝伐珠单抗未纳入医保报销目录。其次,本研究的 dMMR 病例无法区分散发病例和遗传性病例,因为只有少数病例可以收集家族史、BRAF V600E 突变、MMR 胚系突变等信息。第三,由于 dMMR 的 mCRC 为罕见类型,2015 年后的免疫治疗引入使 dMMR 的 mCRC 接受单纯化疗或者贝伐珠单抗联合化疗的病例数无法继续扩充。病例数过少,可能对研究结果产生影响。

综上所述,本研究发现,错配修复缺陷的转移性结直肠癌患者接受贝伐珠单抗联合化疗的总生存时间优于单纯化疗,该结论还需要在更大的队列中验证。目前 dMMR 的转移性结直肠癌的二线标准治疗为 PD-1 单抗,基于本研究和 CALGB/SWOG

80405 的回顾性探索性分析,dMMR 的转移性结直肠癌一线治疗首选贝伐珠单抗联合化疗。

作者声明:本文全部作者对于研究和撰写的论文出现的不端行为承担相应责任;并承诺论文中涉及的原始图片、数据资料等已按照有关规定保存,可接受核查。

学术不端:本文在初审、返修及出版前均通过中国知网(CNKI)科技期刊学术不端文献检测系统的学术不端检测。

同行评议:经同行专家双盲外审,达到刊发要求。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

文章版权:本文出版前已与全体作者签署了论文授权书等协议。

[参考文献]

- [1] Ghiringhelli F, Hennequin A, Drouillard A, et al. Epidemiology and prognosis of synchronous and metachronous colon cancer metastases: a French population-based study [J]. *Dig Liver Dis*, 2014, 46 (9): 854-858.
- [2] Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for metastatic colorectal cancer [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350 (23): 2335-2342.
- [3] 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.
- [4] Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. Cancer stat facts: colon an rectum cancer [EB/OL]. National Cancer Institute. Accessed Jan 13 2017 at <http://seer.cancer.gov/stfacts/html/colorect.html>.
- [5] Maru D, Venook AP, Ellis LM. Predictive biomarkers for bevacizumab: Are we there yet? [J]. *Clinical Cancer Research*, 2013, 19 (11): 2824-2827.
- [6] Hampel H, Frankel WL, Martin E, et al. Screening for the lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal Cancer) [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352 (18): 1851-1860.
- [7] Halvarsson B, Anderson H, Domanska K, et al. Clinicopathologic factors identify sporadic mismatch repair-defective colon cancers [J]. *Am J Clin Pathol*, 2008, 129 (2): 238-244.
- [8] Zaanani A, Shi Q, Taieb J, et al. Role of deficient DNA mismatch repair status in patients with stage III colon cancer treated with FOLFOX adjuvant chemotherapy: A pooled analysis from 2 randomized clinical trials [J]. *JAMA Oncol*, 2018, 4 (3): 379-383.
- [9] Banerjee A, Hands RE, Powar MP, et al. Microsatellite and chromosomal stable colorectal cancers demonstrate poor immunogenicity and early disease recurrence [J]. *Colorectal Dis*, 2009, 11 (6): 601-608.
- [10] Dudley JC, Lin MT, Le DT, et al. Microsatellite instability as a

- biomarker for PD-1 blockade[J]. *Clinical Cancer Res*, 2016, 22 (4) :813-820.
- [11] Pogue-Geile K, Yothers G, Taniyama Y, et al. Defective mismatch repair and benefit from bevacizumab for colon cancer; findings from NSABP C-08[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2013, 105 (13) : 989-992.
- [12] Overbeek LI, Ligtenberg MJ, Willems RW, et al. Interpretation of immunohistochemistry for mismatch repair proteins is only reliable in a specialized setting[J]. *Am J surg pathol*, 2008, 32 (8) : 1246-1251.
- [13] Venderbosch S, Nagtegaal ID, Maughan TS, et al. Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: a pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies[J]. *Clin Cancer Res*, 2014, 20(20) :5322-5330.
- [14] Heinemann V, von Weikersthal LF, Decker T, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a randomised, open-label, phase 3 trial[J]. *Lancet Oncol*, 2014, 15 (10) :1065-1075.
- [15] 汪建平. FOLFOX 方案联合放疗的新辅助治疗在低位直肠癌中的临床多中心研究[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2008, 11(2) : 116-119.
- [16] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会医政医管局. 中国结直肠癌诊疗规范(2017 年版)[J]. *中华外科杂志*, 2018, 12 (1) :3-23.
- [17] Lambrechts D, Lenz HJ, de Haas S, et al. Markers of response for the antiangiogenic agent bevacizumab [J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31 (9) :1219-1230.
- [18] Shibata D, Peinado MA, Ionov Y, et al. Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation[J]. *Nature Genet*, 1994, 6(3) :273-281.
- [19] Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon[J]. *Science*, 1993, 260 (5109) : 816-819.
- [20] Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer[J]. *N Engl J Med*, 2000, 342 (2) :69-77.
- [21] Edge S, Byrd DR, Compton CC, et al. Colon and Rectum. AJCC (American Joint Committee on Cancer) Cancer Staging Manual [M]. New York: Springer, 2010 :143.
- [22] Jessup JM GR, Asare EA. Colon and Rectum. AJCC (American Joint Committee on Cancer) Cancer Staging Manual[M]. Chicago: Amin MB, 2017 :251.
- [23] Smith CG, Fisher D, Claes B, et al. Somatic profiling of the epidermal growth factor receptor pathway in tumors from patients with advanced colorectal cancer treated with chemotherapy +/- cetuximab[J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19 (15) :4104-4113.
- [24] 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.
- [25] Innocenti F, Ou FS, Qu X, et al. Mutational analysis of patients with colorectal cancer in CALGB/SWOG 80405 identifies new roles of microsatellite instability and tumor mutational burden for patient outcome[J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37 (14) :1217-1227.
- [26] Stahler A, Heinemann V, Giessen-Jung C, et al. Influence of mRNA expression of epiregulin and amphiregulin on outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with 5-FU/LV plus irinotecan or irinotecan plus oxaliplatin as first-line treatment (FIRE 1-trial)[J]. *Int J Cancer*, 2016, 138 (3) :739-746.
- [27] Allegra CJ, Yothers G, O'Connell MJ, et al. Bevacizumab in stage II-III colon cancer: 5-year update of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project C-08 trial[J]. *J Clin Oncol*, 2013, 31(3) :359-364.
- [28] Oyama T, Ran S, Ishida T, et al. Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell Maturation through the inhibition of nuclear factor- κ B activation in hemopoietic progenitor cells [J]. *J Immunol*, 1998, 160 (3) :1224-1232.
- [29] Terme M, Pernot S, Marcheteau E, et al. VEGFA-VEGFR pathway blockade inhibits tumor-induced regulatory T-cell proliferation in colorectal cancer[J]. *Cancer Res*, 2013, 73 (2) :539-549.