

晚期大肠癌患者中医证素与 KRAS、BRAF、NRAS 基因突变情况的相关性研究

许仲宁[△] 杨宇飞

摘要 **目的** 研究晚期大肠癌患者 KRAS、BRAF、NRAS 基因突变情况与中医证素的相关性。**方法** 收集 33 例晚期大肠癌患者中医证素和 KRAS、BRAF、NRAS 基因情况(突变“+”或野生非突变“-”)。采用二分类 Logistic 回归分析基因突变情况与证素的相关性。**结果** KRAS 野生型与肝郁呈负相关($P = 0.043, P < 0.05$), KRAS 突变型与肝郁呈正相关($P = 0.043, P < 0.05$)。KRAS 野生型、KRAS 突变型均与脾虚、肺虚、肾虚、阳虚、阴虚、气虚、血虚、痰浊、气滞、血瘀相关性不显著($P > 0.05$)。BRAF 野生型、NRAS 野生型均与肝郁、脾虚、肺虚、肾虚、阳虚、阴虚、气虚、血虚、痰浊、气滞、血瘀逻辑相关性不显著($P > 0.05$)。BRAF 突变型、NRAS 突变型检测阳性者少,未纳入统计分析。**结论** 晚期大肠癌患者 KRAS 基因突变情况与肝郁存在相关性。KRAS 野生型与肝郁呈显著负相关, KRAS 突变型与肝郁呈正相关, BRAF、NRAS 突变与否与中医证素无直接相关性。

关键词 大肠癌; 中医证素; 肿瘤基因突变

Correlation Research between Syndrome Elements of Chinese Medicine and KRAS, BRAF, NRAS Gene Mutations in Advanced Colorectal Cancer Patients XU Zhong-ning and YANG Yu-fei Department of Cancer, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100091)

ABSTRACT **Objective** To study the correlation between syndrome elements of Chinese medicine (CM) and KRAS, BRAF, NRAS gene mutations in advanced colorectal cancer patients. **Methods** Syndrome elements of CM, KRAS, BRAF, NRAS gene mutations (mutation "+" & wild type/non-mutation "-") were collected in 33 advanced colorectal cancer patients. The correlation between gene mutations and syndrome elements of CM was analyzed using binary Logistic regression. **Results** Wild type KRAS (KRAS-) was negatively correlated with Gan depression syndrome ($P = 0.043, P < 0.05$), while KRAS mutation (KRAS+) was positively correlated with Gan depression syndrome ($P = 0.043, P < 0.05$). KRAS- and KRAS+ had no significant relation with Pi deficiency, Fei deficiency, Shen deficiency, yang deficiency, yin deficiency, qi deficiency, blood deficiency, phlegm turbidity, qi stagnation, and blood stasis ($P > 0.05$). BRAF- and NRAS- had no significant relation with Gan stagnation, Pi deficiency, Fei deficiency, Shen deficiency, yang deficiency, yin deficiency, qi deficiency, blood deficiency, phlegm turbidity, qi stagnation, and blood stasis ($P > 0.05$). Positive BRAF and NRAS were seldom found in this study, so they were not statistically analyzed. **Conclusions** There existed correlations between gene mutations and Gan stagnation. KRAS- was negatively correlated with Gan depression, while KRAS+ was positively correlated with Gan depression. Whether there exists mutation of BRAF or NRAS was not correlated with syndrome elements of CM.

KEYWORDS colorectal cancer; syndrome elements of Chinese medicine; cancer gene mutation

基金项目: 中国中医科学院基本科研业务费自主选题资助项目(No. ZZ070854); 北京市科技计划项目(No. Z131107002213101)

作者单位: 中国中医科学院西苑医院肿瘤科(北京 100091)

通讯作者: 杨宇飞, Tel: 010-62835436, E-mail: yuf93@vip.sina.com

[△] 现在四川省肿瘤医院中西医结合科(成都 610041)

DOI: 10.7661/CJIM.2016.12.1445

目前随着基因组学研究发现基因突变与否与肿瘤发病和预后相关。现代医学靶向药物根据基因突变情况,运用同样的药物治疗不同肿瘤,这是目前肿瘤治疗研发的一个方向。肿瘤组织基因检测的个体化印证了中医学整体多系统个体化的“同病异治”、“异病同治”的治疗思路。大肠癌基因检测在大型医院正逐渐应用于临床,但前期文献回顾发现目前尚无中医证素与大肠癌基因检测相关性的研究结论。为发现中医学特征与基因检测的联系,本研究前瞻性地初步分析晚期大肠癌患者 KRAS、BRAF、NRAS 基因突变情况(突变“+”或野生非突变“-”)与中医证素的相关性,探寻不同基因突变类型的中医治疗规律,丰富中西医结合治疗大肠癌的思路。

资料与方法

1 诊断标准 参照《中国常见恶性肿瘤诊治规范》^[1]晚期结直肠癌诊断标准。临床分期采用国际公认的 TNM 分期。中医证素参考《中医诊断学》^[2]和《中药新药临床研究指导原则》^[3],国家中医药管理局发布的《中医病证诊断疗效标准》^[4],中国中西医结合研究会制定的《中医虚证辨证标准》^[5],结合“国家中医药管理局重点专科协作组结直肠癌诊疗方案”和《中医临床诊疗术语-证型部分》^[6],按大肠癌中医病机本虚标实、虚实夹杂的特点,确定《大肠癌中医证素诊断标准》,将中医证素分为“脏腑证素”及“气血阴阳虚实证素”分别进行观察分析。脏腑证素分 5 型:(1)心虚:心悸,心胸憋闷疼痛,心神不宁。(2)肝郁:烦躁易怒、情绪抑郁、胁肋胀满、口苦。(3)脾虚:纳差、便溏、大便规律改变。(4)肺虚:气短、胸闷、咳喘、乏力。(5)肾虚:腰膝酸软、夜尿、头晕、耳鸣、健忘。气血阴阳虚实证素分 8 型:(1)阳虚:形寒肢冷、喜暖、浮肿、面色白、舌润,脉沉弱。(2)阴虚:大便干结、五心烦热、口渴喜饮、五窍干涩、潮热盗汗、舌嫩红、苔少,脉细。(3)气虚:自汗、乏力、易累、气短、少气、懒言、舌淡、脉弱。(4)血虚:面色萎黄、唇甲色淡、出血、舌白、脉细。(5)痰浊:痰多、痰核(体表的局限性包块)、舌苔厚腻,脉滑。(6)气滞:胸腹胀满、结块、情志抑郁、脉弦。(7)血瘀:疼痛、瘀斑、肿块、肌肤甲错、舌暗紫、

有瘀点。(8)湿热:下利不爽,里急后重、肛门灼热疼痛、或下利脓血、小便黄、舌红、苔黄腻。

2 纳入及排除标准 纳入标准:有明确病理诊断的结直肠癌患者;TNM 分期为Ⅳ期;年龄 18~80 岁,性别不限;自愿接受中医治疗者;无严重心、肝、肾功能异常;签署知情同意书。排除标准:合并严重心、肝、肾并发症;任何不稳定情况或可能危害患者安全的情况;研究者判断依从性较差或不能配合完成研究的患者;无法判断中医证素及缺乏基因检测结果者。

3 一般资料 33 例均为 2014 年 3 月—2015 年 3 月中国中医科学院西苑医院肿瘤科住院及门诊收治的具有基因检测报告的Ⅳ期结直肠癌患者。男性 14 例,女性 19 例,年龄 54~71 岁,平均(62.71±8.5)岁;病程 11~26 个月,平均(18.64±7.50)个月。其中直肠癌 14 例,结肠癌 19 例,直肠结肠交界癌 0 例。

4 观察指标及方法 临床信息采集方法:患者入组后收集中医四诊信息及基因检测情况 KRAS(Exon 2、3)、BRAF(Exon15 号外显子 V600E)、NRAS(Exon 2、3)(基因突变状况采用 Ion torrent PGM 半导体芯片直接测序法检测),根据《大肠癌中医证素诊断标准》确定患者中医证素情况。采用双人核对方式输入数据录入 Excel 数据库。

5 统计学方法 运用统计软件 SPSS 19.0 分析数据。以基因突变类型为组别分别统计,基因与证素的直接相关性用二分类 Logistic 回归分析,二分类 Logistic 回归分析中以中医证素为自变量,基因型为因变量,方法选用“方程进入法”,自变量赋值后,变量进入回归方程, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 大肠癌各基因与证素分布情况(表 1) 共收集晚期大肠癌患者 33 例。KRAS 野生型(KRAS-)22 例,KRAS 突变型(KRAS+)10 例,BRAF 野生型(BRAF-)25 例,BRAF 突变型(BRAF+)2 例,NRAS 野生型(NRAS-)24 例,NRAS 突变型(NRAS+)3 例。BRAF 突变型和 NRAS 突变型的样本量少,未纳入 Logistic 回归分析。

表 1 大肠癌基因与证素分布情况 (例)

基因	肝郁	脾虚	肾虚	肺虚	心虚	阳虚	阴虚	气虚	血虚	气滞	血瘀	痰浊	湿热
KRAS -	7	21	19	14	0	10	2	8	6	20	20	13	0
KRAS +	6	8	8	3	0	7	1	5	3	8	8	5	0
BRAF -	10	24	20	14	0	13	3	10	6	20	20	15	0
NRAS -	9	24	19	12	0	9	2	10	7	19	18	13	0

2 大肠癌各基因与证素 Logistic 回归相关性分析

2.1 大肠癌 KRAS - 与脏腑证素 Logistic 回归相关性(表 2、3) KRAS - 与肝郁呈负相关($P = 0.043 < 0.05$)。KRAS - 与脾虚、肺虚、肾虚、阳虚、阴虚、气虚、血虚、痰浊、气滞、血瘀相关性不显著($P > 0.05$),未进入回归方程,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 大肠癌 KRAS - 与脏腑证素 Logistic 回归相关性

证素	B	S. E.	Wals	df	Sig.	Exp (B)
肝郁	-1.943	0.961	4.083	1	0.043	0.143
脾虚	20.378	40 192.998	0.000	1	1.000	707 720 184.415
肺虚	1.278	1.005	1.618	1	0.203	3.590
肾虚	-0.416	1.371	0.092	1	0.762	0.660
常量	-18.844	40 192.998	0.000	1	1.000	0.000

表 3 大肠癌 KRAS - 与阴阳气血虚实证素

Logistic 回归相关性

证素	B	S. E.	Wals	df	Sig.	Exp (B)
阳虚	-0.860	0.951	0.816	1	0.366	0.423
阴虚	-1.314	1.285	1.046	1	0.307	0.269
气虚	-0.640	1.320	0.235	1	0.628	0.527
血虚	-0.225	1.287	0.031	1	0.861	0.799
痰浊	-0.091	0.911	0.010	1	0.920	0.913
气滞	-0.768	1.287	0.356	1	0.551	0.464
血瘀	-0.768	1.287	0.356	1	0.551	0.464
常量	2.604	1.398	3.471	1	0.062	13.514

2.2 大肠癌 KRAS + 与脏腑证素 Logistic 回归相关性(表 4、5) KRAS + 与肝郁呈显著正相关($P = 0.043 < 0.05$)。KRAS + 与脾虚、肺虚、肾虚、阳虚、阴虚、气虚、血虚、痰浊、气滞、血瘀逻辑相关性不显著($P > 0.05$),未进入回归方程,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 4 大肠癌 KRAS + 与脏腑证素 Logistic 回归相关性

证素	B	S. E.	Wals	df	Sig.	Exp (B)
肝郁	1.943	0.961	4.083	1	0.043	6.977
脾虚	-20.378	40 192.971	0.000	1	1.000	0.000
肺虚	-1.278	1.005	1.618	1	0.203	0.279
肾虚	0.416	1.371	0.092	1	0.762	1.515
常量	18.844	40 192.998	0.000	1	1.000	152 773 062.000

2.3 大肠癌 BRAF - 与脏腑证素 Logistic 回归相关项分析(表 6、7) BRAF - 与肝郁、脾虚、肺虚、肾虚、阳虚、阴虚、气虚、血虚、痰浊、气滞、血瘀逻辑相关性不显著($P > 0.05$),未进入回归方程,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.4 大肠癌 NRAS - 与脏腑证素 Logistic 回归相关性(表 8、9) NRAS - 与肝郁、脾虚、肺虚、肾虚、阳虚、阴虚、气虚、血虚、痰浊、气滞、血瘀逻辑相关性不显著($P > 0.05$),未进入回归方程,差异无统计学意义

($P > 0.05$)。

表 5 大肠癌 KRAS + 与阴阳气血虚实证素

Logistic 回归相关性

证素	B	S. E.	Wals	df	Sig.	Exp (B)
阳虚	0.860	0.951	0.816	1	0.366	2.362
阴虚	1.314	1.285	1.046	1	0.307	3.720
气虚	0.640	1.320	0.235	1	0.628	1.897
血虚	0.225	1.287	0.031	1	0.861	1.252
痰浊	0.091	0.911	0.010	1	0.920	1.095
气滞	0.768	1.287	0.356	1	0.551	2.155
血瘀	0.768	1.287	0.356	1	0.551	2.155
常量	-2.604	1.398	3.471	1	0.062	0.074

表 6 大肠癌 BRAF - 与脏腑证素 Logistic 回归相关性

证素	B	S. E.	Wals	df	Sig.	Exp (B)
肝郁	-0.916	1.396	0.431	1	0.512	0.400
脾虚	-0.674	42 116.792	0.000	1	1.000	0.510
肺虚	-19.836	12 583.712	0.000	1	0.999	0.000
肾虚	-20.213	17 771.858	0.000	1	0.999	0.000
常量	42.332	43 946.710	0.000	1	0.999	69 029 600.000

表 7 大肠癌 BRAF - 与阴阳气血虚实证素 Logistic 回归相关性

证素	B	S. E.	Wals	df	Sig.	Exp (B)
阳虚	-0.555	10 202.089	0.000	1	1.000	0.574
阴虚	-54.037	13 531.452	0.000	1	0.997	0.000
气虚	-72.415	17 055.905	0.000	1	0.997	0.000
血虚	36.045	10 862.042	0.000	1	0.997	7 461 806.000
痰浊	18.034	8 029.428	0.000	1	0.998	902 045.220
气滞	-19.641	15 919.040	0.000	1	0.999	0.000
血瘀	-19.641	15 919.040	0.000	1	0.999	0.000
常量	74.577	19 615.631	0.000	1	0.997	16 375 000.000

表 8 大肠癌 NRAS - 与脏腑证素 Logistic 回归相关性

证素	B	S. E.	Wals	df	Sig.	Exp (B)
肝郁	0.000	1.225	0.000	1	1.000	1.000
脾虚	42.406	41 980.190	0.000	1	0.999	354 800 100.000
肺虚	-20.510	12 118.636	0.000	1	0.999	0.000
肾虚	-20.510	17 974.842	0.000	1	0.999	0.000
常量	-0.693	44 029.192	0.000	1	1.000	0.500

表 9 大肠癌 NRAS - 与阴阳气血虚实证素 Logistic 回归相关性

证素	B	S. E.	Wals	df	Sig.	Exp (B)
阳虚	-52.915	12 616.925	0.000	1	0.997	0.000
阴虚	-36.073	9 864.335	0.000	1	0.997	0.000
气虚	-1.099	1.581	0.483	1	0.487	0.333
血虚	18.241	6 463.097	0.000	1	0.998	83 543 238.260
痰浊	0.000	1.633	0.000	1	1.000	1.000
气滞	-19.114	14 142.501	0.000	1	0.999	0.000
血瘀	-19.021	14 022.311	0.000	1	0.999	0.000
常量	73.128	18 952.497	0.000	1	0.997	8 100 000.000

讨 论

目前随着基因组学的发展,肿瘤的个体基因分析鉴别、诊断、疗效预测、药物相关性等方面有了进步,越发强调治疗的个体化。这印证了中医学整体多系统个体化的治疗思路“同病异治”、“异病同治”。例如 KRAS 基因突变与否与肿瘤发病和预后相关,在结直肠癌、肺癌和胰腺癌中突变率比较高。BRAF 基因突变最常见于恶性黑色素瘤、乳头状甲状腺癌、结直肠癌。KRAS、BRAF 基因不只在在大肠癌中表达异常,在其他肺癌、胰腺癌、甲状腺癌、恶性黑色素瘤也有表达,现代医学靶向药物根据基因突变情况,运用同样的药物治疗不同的肿瘤,这是目前肿瘤生物医学研究的一个重要方向^[7]。中医通过宏观的四诊合参方式诊治疾病,用“证素”“证型(多个证素集合)”的方式归纳患者的个体化差异特征,现代医学用微观的生物基因技术(肿瘤基因检测)确定患者个体化差异特征,两者殊途同归。为了具体发现两者的相关性,本研究前瞻性地初步分析比较中医证素与基因表达之间的具体联系,为中西医治疗肿瘤提供新的思路及研究发现。

李泽^[8]研究发现 KRAS 基因突变与结直肠癌低分化、肝脏转移关系密切,多变量分析显示肝脏转移、KRAS 基因突变、肿瘤低分化是预后的独立危险因素。该结论提示 KRAS 基因突变易导致肝脏转移,与肝脏关系密切。本研究发现 KRAS + 肝郁率更高, KRAS - 肝郁率更低、KRAS 野生非突变型与肝郁呈显著负相关, KRAS 突变型与肝郁呈正相关,肝郁更多出现在 KRAS 突变的患者中,肝郁与 KRAS 突变关系密切。本研究从中医学角度发现 KRAS 突变与肝密切相关,与前者从现代医学角度研究的结论互相印证。从中医学理论分析,肝主疏泄和藏血,调畅气机,推动血和津液运行,肝失疏泄,气机郁结,血津输布障碍,形成瘀血、痰核,日久结成肿块,导致肝转移瘤的形成。由此间接地可以推测:肝郁易合并 KRAS 基因突变、KRAS 基因突变者多伴随肝郁,肝郁容易成为大肠癌肝转移的促发因素,促进大肠癌恶化。因为肿瘤病的特殊性,患者往往不易透露真实的内心感受,医师从而忽略调畅情志,行气疏肝在大肠癌治疗中的重要性,而过多强调补益脾肾,使治疗思路较为单一。通过患者 KRAS 突变的检测结果可以为医师对患者严重不良情绪提供参考,再结合四诊确定肝郁,中西结合诊断,提高诊治准确性。

结合目前的现代医学临床研究结论^[9,10], KRAS 野生型结肠癌或合并肝转移者选用靶向药物西妥昔单抗、贝伐单抗或帕尼单抗联合化疗(FOLFIRI 或

mFOLFOX6)疗效优于单纯化疗,生存期延长。对于 KRAS 突变型的靶向治疗却有限,可选择的靶向药物少,治疗手段较 KRAS 野生型少。虽然有研究发现 K-ras 13 密码子突变 G13D 应用西妥昔单抗治疗后有更长的总生存期和更长的无进展生存期^[11]。但依然疗效低于 KRAS 野生型结肠癌患者。通过本研究结论可以为 KRAS 突变大肠癌患者提供新的中医治疗思路: KRAS 突变型患者不仅脾肾亏虚,气滞血瘀,且更易肝郁,气阳不足。因此在补益脾肾的基础上,加强疏肝行气活血,益气温阳,调畅情志,尝试丰富 KRAS 突变患者的中西医治疗方式。

综上所述,晚期大肠癌患者肝郁和 KRAS 突变直接相关, KRAS 突变的患者肝郁率更高, KRAS 野生非突变型则相反,肝郁容易成为大肠癌肝转移的促发因素。大肠癌 KRAS 突变患者中医治疗应重视从肝论治,疏肝解郁。本研究作为一种新的探索性分析,揭示了部分规律,因病源有限,研究结果尚需临床的长期验证及不断丰富。

参 考 文 献

- [1] 全国肿瘤防治研究办公室,中国抗癌协会编. 中国常见恶性肿瘤诊治规范(第3分册大肠癌)[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1991:7-21.
- [2] 邓铁涛主编. 中医诊断学(高等中医药院校教学参考丛书)[M]. 第2版. 北京:人民卫生出版社, 2008:157-215.
- [3] 郑筱萸主编. 中药新药临床研究指导原则[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2002:78-99.
- [4] 国家中医药管理局.《中华人民共和国中医药行业标准——中医病证诊断疗效标准》[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2012:56-89.
- [5] 沈自尹,王文健. 中医虚证辨证参考标准[J]. 中西医结合杂志, 1988, 10(2): 598.
- [6] 朱文峰,王永炎主编. 中医临床诊疗术语——证型部分[M]. 北京:中国标准出版社, 1997: 8-85.
- [7] 陈龙,韩盛玺. BRAF 基因与结肠癌的关系及临床意义[J]. 实用医院临床杂志, 2009, 6(3): 123-124.
- [8] 李泽. 大肠癌 KRAS 基因遗传变异的研究及靶向治疗预后评估[D]. 长春:吉林大学, 2013.
- [9] Ye LC, Liu TS, Ren L. 西妥昔单抗联合化疗治疗 KRAS 野生型不能切除的结肠癌肝转移随机对照临床试验[J]. 消化肿瘤杂志(电子版), 2013, 5(2): 113.
- [10] 马东. 帕尼单抗联合 FOLFOX4 一线治疗使 KRAS 野生型转移性结肠癌的总生存期延长[J]. 循证医学, 2011, 11(4): 238.
- [11] De Roock W, Jonker DJ, Di Nicolantonio F. Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab[J]. JAMA, 2010, 304(16): 181-182.

(收稿:2016-02-22 修回:2016-04-26)