

临床研究

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2020.19.012

中医辨证治疗晚期结直肠癌化疗失败患者
循环肿瘤 DNA 状态与预后的相关性曲骞¹, 杨国旺², 侯炜³, 孙红⁴, 李刘生¹, 郝腾腾¹, 崔宁¹, 李中玉¹, 吴娇¹, 吴煜^{1*}

1. 中国中医科学院西苑医院, 北京市海淀区西苑操场 1 号, 100091; 2. 首都医科大学附属北京中医医院; 3. 中国中医科学院广安门医院; 4. 北京大学肿瘤医院

摘要 目的 探讨中医辨证治疗晚期结直肠癌化疗失败患者循环肿瘤 DNA (ctDNA) 状态、突变基因及其与预后相关性。方法 收集 83 例晚期结直肠癌化疗失败患者外周血 10 ml, 利用定制的覆盖 416 个肿瘤相关基因探针的 Geneseeq One NGS 面板进行杂交富集。高效捕获后进行聚合酶链式反应 (PCR) 扩增, 在 HiSeq NGS 平台 (Illumina) 上对目标富集的文库进行测序。结果 在纳入的 83 例经中医辨证治疗的晚期结直肠癌化疗失败患者中, 有 54 例 (65.06%) 血浆中检测出肿瘤相关突变基因, 共 152 个基因。根据突变频率筛选出 APC、TP53、KRAS、PIK3CA 等前 20 位的基因; ctDNA 突变频率、肿瘤突变负荷 (TMB)、KRAS、PIK3CA 均与预后显著相关 ($P < 0.05$); 临床相关因素分析显示, 肝转移与多个肿瘤基因不良突变相关 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 脾肾两虚证与 ctDNA 突变频率、TMB、TP53 相关 ($P < 0.05$), 八纲辨证中阴证、阳证与 TMB 相关 ($P < 0.05$)。结论 外周血 ctDNA 可以较好地反映中医辨证治疗的晚期结直肠癌化疗失败患者分子生物学状态, 脾肾两虚证与较低的 ctDNA 突变频率、较低的抑癌基因突变存在相关性; 阴证患者 TMB 较低, 阳证患者 TMB 较高。

关键词 晚期结直肠癌; 中医药疗法; 化疗; 循环肿瘤 DNA; 脾肾两虚证; 肿瘤突变负荷

结直肠癌是世界范围内发病率较高的恶性肿瘤之一, 在所有恶性肿瘤中居于第三位^[1]。近 20 年来, 结直肠癌的分子靶向治疗和免疫治疗取得了巨大进步, 因此, 明确结直肠癌患者相关基因分子生物学状态, 以指导临床选择最佳的治疗方案, 对于晚期结直肠癌患者的治疗与预后尤为重要。近年来中医药对于晚期结直肠癌临床效果得到进一步验证^[2], 但是对于转移性结直肠癌常规治疗失败的患者的治疗方案尚未达成一致, 对于其分子生物学特点及基因状态研究尚处于探索阶段。本研究通过液体活检高通量二代基因测序技术 (next-generation sequencing technology, NGS) 对化疗失败 (常规化疗后进展或无法耐受) 后接受中医药治疗的晚期结直肠癌患者的循环肿瘤 DNA (circulating tumor DNA, ctDNA) 进行检测, 对其分子生物学

状态及其与临床因素、中医证型、预后的相关性进行探索。

1 临床资料

1.1 诊断及辨证标准

西医诊断标准参照 2000 版世界卫生组织 (WHO) 肿瘤分类结直肠癌的定义^[3]进行诊断。结直肠癌分期标准参照 TNM 分期标准^[4-5], 分为 0 ~ IV 期。

中医辨证标准参照《中医病证诊断疗效标准》^[6]、《中药新药临床研究指导原则》^[7]、《中医虚证辨证参考标准》^[8]并结合国家中医药管理局重点专科协作组《结直肠癌中西医结合诊疗方案》^[9]综合拟定: 1) 脾肾两虚证: 腹胀隐痛, 久泻不止, 大便夹血, 血色暗淡, 或腹部肿块, 面色萎黄, 四肢不温, 舌质淡胖, 苔薄白, 脉沉细或沉迟。2) 肝肾不足证: 腹胀痛, 大便形状细扁, 或带黏液脓血或便干, 腰膝酸软, 失眠, 口干咽燥,

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFC1700606); 北京市科技计划项目 (D161100005116002)

* 通讯作者: wy713@vip.sina.com, (010) 62835438

烦躁易怒，头晕耳鸣，口苦，胁肋胀痛，五心烦热，舌红少苔，脉细数。3) 痰湿内蕴证：里急后重，或大便脓血，腹部阵痛，舌质红或紫暗，苔黄或白腻，脉滑。4) 瘀毒内阻证：面色暗滞，腹痛固定不移，大便脓血，血色紫暗，口唇暗紫，或舌有瘀斑，或脉涩。5) 气血亏虚证：体瘦腹满，面色苍白，肌肤甲错，食少纳差，神疲乏力，头晕心悸，舌质淡，苔薄白，脉细弱。中医八纲阴阳辨证参照《实用中医诊断学》^[14] 中阴证及阳证标准。

1.2 纳入标准

符合上述诊断标准及辨证方案且有明确病理诊断者；TNM 分期^[4-5] 为Ⅳ期；年龄 18~80 岁；常规化疗失败即化疗后进展或无法耐受继续化疗者（常规化疗方案含有氟尿嘧啶类、奥沙利铂、伊立替康）；同时接受中医药辨证治疗连续 3 个月以上；预计生存期 > 3 个月；签署知情同意书。

注：1) 化疗后进展：定义为治疗过程中疾病进展或末次治疗后的 3 个月内疾病进展，均有明确影像学证据。2) 无法耐受化疗：定义为因无法耐受化疗不良事件而退出标准治疗的患者，按常见不良反应事件评价标准（CTCAE）4.0 标准^[15]，其不耐受的血液学不良事件严重等级需达到Ⅳ度及以上（血小板下降为Ⅲ度及以上）或非血液学不良事件严重等级达到Ⅲ度及以上，且研究者判断该受试者重复原方案治疗仍然无法耐受。

1.3 排除标准

既往或合并其他恶性肿瘤者，但已治愈的皮肤基底细胞癌和宫颈原位癌除外；合并严重心、肝、肾并发症；已出现肠梗阻不能服用汤药，需要静脉内高能营养者；合并吸收不良综合征或其他影响胃肠道吸收的疾病，或合并活动性消化性溃疡病者。

1.4 一般资料

纳入来自中国中医科学院西苑医院（76 例）、中国中医科学院广安门医院（2 例）、首都医科大学附属北京中医医院（4 例）、北京大学肿瘤医院（1 例）4 家中心共 83 例接受中医辨证治疗的晚期结直肠癌化疗失败患者并进行了外周血 ctDNA 检测，其中年龄 ≥ 65 岁者 29 例（34.94%），< 65 岁者 54 例（65.06%）；男性 48 例（57.83%），女性 35 例（42.17%）；左半结肠癌 65 例（78.31%），右半结肠癌 18 例（21.69%）；既往治疗线数 ≤ 二线 67 例（80.72%），≥ 三线 16 例（19.28%）；转移部位 1 处 37 例（44.58%），≥ 2

处 46 例（55.42%）；有肝转移病灶 50 例（60.24%），肺转移病灶 40 例（48.19%），淋巴结转移 19 例（22.89%）；中医证型中脾肾两虚证 43 例（51.81%），肝肾不足证 11 例（13.25%），气血两虚证 4 例（4.82%），痰湿内蕴证 9 例（10.84%），瘀毒内阻证 16 例（19.28%），八纲辨证阴证 57 例（68.67%）、阳证 26 例（31.33%）。本研究经中国中医科学院西苑医院伦理委员会审批通过（批件号：2016XLA1213）。

2 方法

2.1 样本采集

采集患者 10 ml 外周静脉血，置于 EDTA 管中，在室温下吸取上清血浆，-80℃ 保存。本研究在临床检测中心（南京世和基因生物技术有限公司）进行高通量二代基因测序。

2.2 DNA 提取、杂交捕获和测序

根据检测中心提供的方案，利用 NucleoSpin Plasma XS 试剂盒 [Macherey NAGEL (MNG) 公司，批号：740900.10] 提取循环 DNA (circulating free DNA, cfDNA)，使用 DNeasy Blood&Tissue 试剂盒 (Qiagen 凯杰生物有限公司，批号：69104) 和 NimbleGen SeqCap EZ Hybridization and Wash Kit (Roche) 捕获 ctDNA。捕获的基因文库用 Illumina P5 和 P7 进行扩增。捕获后扩增的文库用 Agencourt AM Pure XP 珠子纯化，用 Qubit 3.0 荧光定量仪初步定量。文库片段大小再由 Agilent Technologies 2100 生物分析仪检测。利用定制的覆盖 416 个肿瘤相关基因探针的 Geneseeq One NGS 面板进行杂交富集。这 416 个基因包括与靶向治疗和化疗疗效相关的临床相关基因、常见的癌症驱动基因、与遗传性癌症相关的基因，以及在实体肿瘤复发时突变并与肿瘤发生相关的基因。因此，可以检测到这 416 个基因的所有类型的基因组改变，包括单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP)、插入缺失标记 (insertion-deletion, INDEL)、拷贝数变异 (copy number variation, CNV) 和基因融合。富集质控采用 Agilent Bioanalyzer 2100 生物分析仪。根据制造商的说明，经链霉亲和素磁珠吸附高效捕获，后进行 PCR 扩增，在 HiSeq NGS 平台 (Illumina) 上对目标富集的文库进行测序。

2.3 序列数据处理

采用 TRIMMOATIC 软件进行 FASTQC 文件质

量控制。使用带参数 (-8-M) 的 Burrows-Wheeler Aligner (BWA-mem, v0.7.12) 将每个样本的读数映射到参考序列 hg19 (human genome version19)。使用基因组分析工具包 (GATK 3.4.0) 对 indels 周围的局部重新排列和基本质量评分重新校准。采用 VarScan2 检测体细胞突变。通过 FACTER 用默认参数鉴定基因组融合。拷贝数变异 (CNV) 的检测使用默认参数的 ADTEX (<http://adtex.sourceforge.net>)，用配对的正常/肿瘤样本检测每个基因的体细胞 CNV。

2.4 ctDNA 计算

以突变的等位基因频率 (AF) 为研究指标，即样本基因变异序列数目与参考序列数目的比值，反应该基因突变的频率。AF 越高，表明肿瘤细胞占的百分比越大。选每例患者检测到的高的等位基因频率作为观察指标^[12-13]。

2.5 统计学方法

使用 SPSS 21.0 统计软件，均采用双侧检验，检验水准定为 0.05，参数的可信区间估计采用 95% 可信区间。采用 χ^2 和 Fisher 确切概率法对分类变量的关系进行检验，单因素生存分析采用 Kaplan-Meier 分析，生存曲线差异分析采用 Log-Rank 分析方法作出各组别相应的生存曲线。

3 结果

3.1 83 例患者血液 ctDNA 突变检测结果

在 83 例中医辨证治疗晚期结直肠癌化疗失败患者中，有 54 例 (65.06%) 血浆中检测出肿瘤相

关突变基因，共 152 个基因和 419 个突变位点，有 29 例 (34.94%) 未检测出肿瘤相关突变。根据突变频率筛选出前 20 位的基因，其中 APC 基因突变为 43 例 (51.81%)，TP53 基因突变为 43 例 (51.81%)，KRAS 基因突变为 22 例 (26.51%)，PIK3CA 基因突变为 11 例 (13.25%)。另外有 6 例患者存在胚系基因突变，分别为 APC、RAD51C、PDE11A、ABCB1、TTF1，其中 APC、RAD51C 为已知的致病性基因。详情具体见图 1、图 2。

3.2 ctDNA 突变基因与预后相关性分析

本研究根据 ctDNA 突变的等位基因频率不同，取 2.5% 为临界值，将受试者分为高突变组 (42 例) 和低突变组 (41 例)。ctDNA 高突变组中位总生存期 (OS) 明显高于低突变组 (17.47 个月及

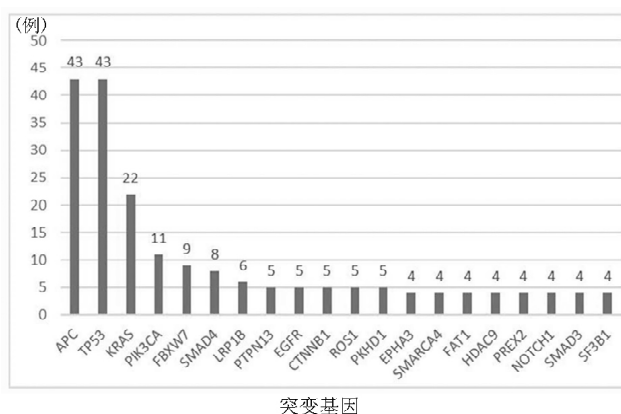
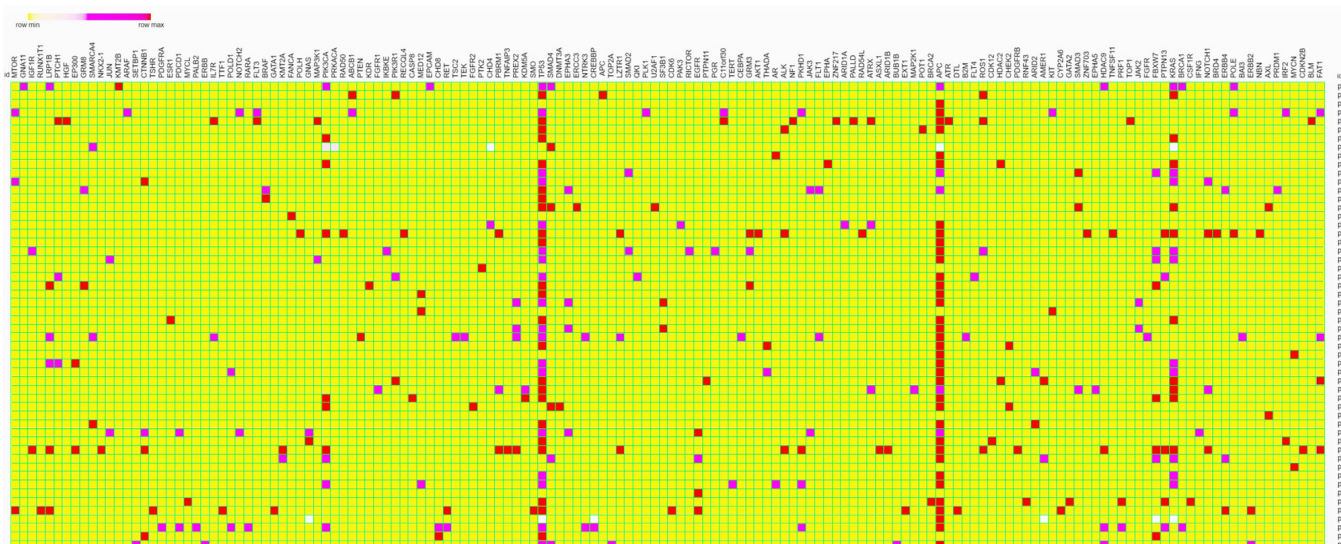


图 1 83 例晚期结直肠癌化疗失败患者血浆前 20 位突变基因频率分析



注：横向代表突变基因名称，纵向为样本编号，红色色块代表突变基因，颜色越深则突变频率越高

图 2 83 例晚期结直肠癌化疗失败患者血浆 152 个突变基因在样本中的分布情况

8.57 个月, $P=0.033$), 生存函数见图 3。将患者的肿瘤突变负荷 (TMB) 取 3 个/Mb 为临界值, 受试者分为高突变负荷组 (38 例) 与低突变负荷组 (45 例), 两组在中位 OS 上差异有统计学意义 (16.63 个月及 10.00 个月, $P=0.007$), 生存函数见图 4。KRAS 突变型的患者较 KRAS 野生型预后更差 (8.57 个月及 16.63 个月, $P=0.047$), 生存函数见图 5。PIK3CA 突变型的患者较野生型预后更差 (6.97 个月及 15.80 个月, $P=0.045$), 生存函数见图 6。APC、TP53 的基因状态与生存期无显著相关性 ($P>0.05$)。

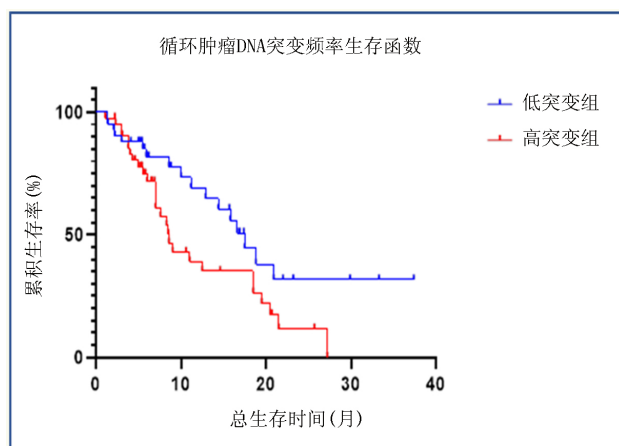


图 3 晚期结直肠癌化疗失败患者循环肿瘤 DNA 突变频率对总生存期的影响

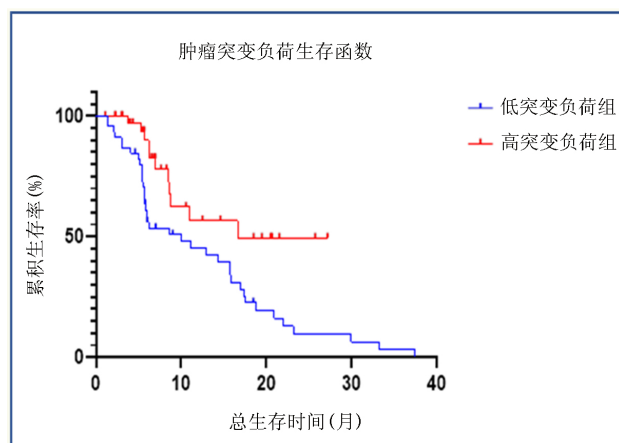


图 4 晚期结直肠癌化疗失败患者肿瘤突变负荷对总生存期的影响

3.3 基因突变与临床因素的关系

表 1 示, 在 ctDNA 等位基因突变频率与临床因素亚组分析中肝转移、脾肾两虚证存在显著相关性 ($P<0.05$); TMB 与临床因素的分析中肝转移、肺转移、脾肾两虚证、八纲辨证中的阴证、阳证与之存在显著相关性 ($P<0.05$)。

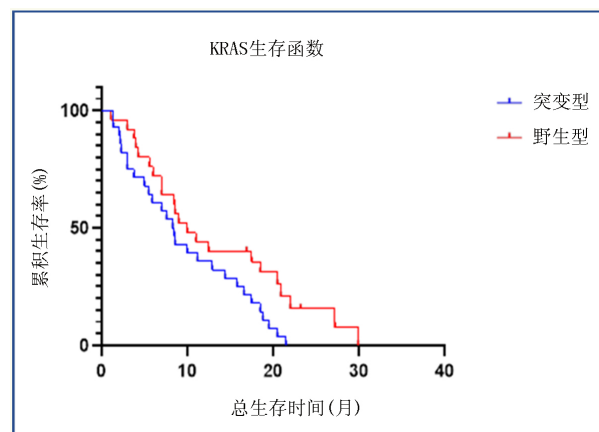


图 5 晚期结直肠癌化疗失败患者 KRAS 基因状态对总生存期的影响

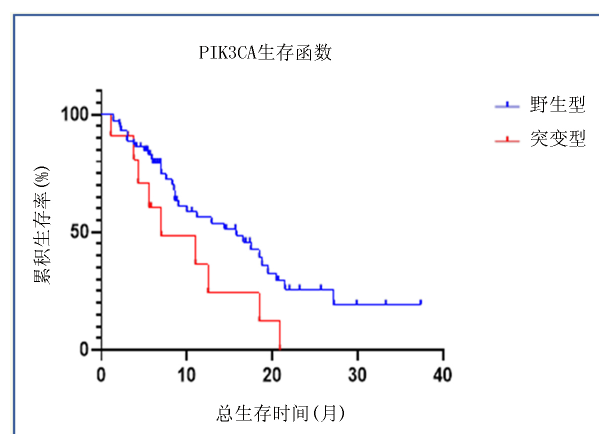


图 6 晚期结直肠癌化疗失败患者 PIK3CA 基因状态对总生存期的影响

表 1 晚期结直肠癌化疗失败患者 ctDNA 突变频率、TMB 状态与临床因素的关系

临床因素	突变频率 (例)			TMB (例)		
	高突变	低突变	P 值	高突变	低突变	P 值
肝转移						
无	11	22	0.014	9	24	0.007
有	31	19		29	21	
肺转移						
无	20	23	0.521	15	28	0.049
有	22	18		23	17	
中医证型						
脾肾两虚	17	26	0.037	14	29	0.012
非脾肾两虚	25	15		24	16	
八纲阴阳辨证						
阴证	25	32	0.098	22	35	0.044
阳证	17	9		16	10	

注: ctDNA, 循环肿瘤 DNA; TMB, 肿瘤突变负荷

表 2 示, KRAS 突变与肝转移存在显著相关性; PIK3CA 基因突变与年龄存在相关性; TP53 基因突变与肝转移、脾肾两虚证显著相关 ($P<0.05$)。而 APC 基因突变情况未找到与之显著相关

的临床因素。

表 2 晚期结直肠癌化疗失败患者临床因素与 KRAS、PIK3CA、TP53 基因突变的关系

基因	临床因素	突变 (例)	野生 (例)	P 值
KRAS	肝转移			
	无	3	30	0.002
	有	20	30	
PIK3CA	年龄			
	≥65	1	2	0.050
	<65	10	44	
TP53	肝转移			
	无	7	26	0.001
	有	29	21	
中医证型	脾肾两虚	12	31	0.003
	非脾肾两虚	24	16	

4 讨论

随着研究的不断深入和第二代基因测序技术的广泛应用, ctDNA 展现出极大的潜力, 可作为监测和分析疾病的基因标志物。本研究中前 20 位的基因按照功能划分多数为信号传导相关基因, 如 APC、KRAS、PIK3CA、SMAD4、PTPN13、EGFR、CTNNB1、ROS1、FAT1、PREX2、NOTCH1, 以及细胞周期与凋亡相关基因: TP53、FBXW7、HDAC9, 涉及 MAKP、Rho、Notch 等多条信号通路, 其余突变基因涉及表观遗传相关、剪接子、转录等其他相关功能。前 4 位突变频率较高的基因中 KRAS、PIK3CA 与 OS 相关, KRAS 突变是 IV 期肿瘤总生存期较短的独立危险因素^[4], 而 PIK3CA 突变诱导的 PI3k/Akt 激活有助于大肠癌干细胞的存活和增殖, 使细胞进一步对化疗产生耐药性^[5]。ctDNA 突变频率、TMB 生存数据与既往研究^[6-19]一致, 同时在临床因素相关分析中肝、肺器官转移作为独立危险因素与多个不良基因突变相关。

人类基因组学属于人类先天的遗传物质, 遗传禀赋属于内在因素, 在后天各种诱发因素下发生各种突变属于外因诱导, 或是本身存在胚系基因这类先天突变致病基因造成后天较高概率肿瘤的发生, 其先后天的致病机制恰恰对应中医基础理论中五脏学说中的先天之本与后天之本, 即肾为先天之本, 藏先天之精, 脾为后天之本, 气血化生之源, 二者相互资助, 共为人体根本。而在致病病因过程中我们也可以看出, 肿瘤也存在内因与外因交织致病, 对应中医病因学中的“三因学说”。现代医家认为, 结直肠癌由脾胃虚弱, 脏腑功能失调, 痰浊瘀毒交结, 日久蕴积而成, 总体病机本虚标实。晚期

患者癌毒耗伤人体精气血津液, 由脾及肾, 气血阴阳俱损。本研究纳入的晚期结直肠癌化疗失败患者, 脾肾两虚是其本虚之源头。

有学者通过研究发现, 晚期结直肠癌中医证型以脾肾阳虚、气血亏虚、瘀毒内阻最为常见, 具有本虚标实、虚实夹杂、易出现多脏亏虚的证候特点^[20-22]。患者多次化疗以后, 湿、热、瘀、毒等实证减少, 脾、肾、肝、胃等脏器虚衰之虚证增加, 证型由实证或虚实夹杂证演变为虚证, 最终演变为脾肾亏虚^[23-24]。因此, 临床辨证施治中无论早期晚期, 宜始终注重调补脾肾、培土固本的治则。组方规律中黄芪、人参、白术、黄芩等益气健脾药物居多, 与祛瘀解毒药物配伍使用以改善晚期患者生活质量, 缓解症状, 减轻不良反应^[25]。本研究中医辨证分型中脾肾两虚证患者过半, 因此着重从脾、肾两脏入手, 将患者整体划分为脾肾两虚证与非脾肾两虚证, 探讨中医药治疗结直肠癌化疗失败患者肿瘤基因状态与预后的关系。经过筛选我们发现, 在 ctDNA 突变频率、TMB 水平及 TP53 突变基因与临床因素的亚组分析中, 脾肾两虚证均与其相关。从 ctDNA 突变频率看, 脾肾两虚证患者多为低突变频率, 预后较好的低突变组中脾肾两虚证的患者占比要高于非脾肾两虚证, TP53 基因野生型状态预后较好, 其中脾肾两虚证的患者占比较高, TP53 是已知的抑癌基因, 其突变可促进细胞癌变, 脾肾两虚证患者预后较好说明健脾补肾治法在降低肿瘤突变频率及抑癌基因突变方面可能存在优势。而在 TMB 中, 脾肾两虚证在预后较差的低突变负荷组中占比较高, TMB 是免疫治疗预后的重要指标, 通过亚组分析脾肾两虚证患者因体内正气亏损, 正邪交争不剧烈, 瘤体缺乏高频突变, 脾肾两虚证在体细胞突变上不占优势, 则此类脾肾两虚证患者对免疫治疗可能获益不佳, 因此需要在健脾补肾的同时通过其他途径激活体内免疫机制。

八纲辨证是中医辨证的总纲, 而其中阴阳是辨别疾病性质的两纲, 是八纲的总纲, 阴证是体内阳气虚衰的证候, 由脏腑器官功能低下、机体反应衰减而形成, 对应肿瘤患者病程长、晚期、年老、一般基础状况差, 呈现一派虚寒的表现; 阳证是体内阳气亢盛、正气未衰的证候, 由脏腑器官机能亢进而形成, 对应肿瘤患者病程短、青壮年、一般状况尚可, 有实热的表现。本研究纳入的是化疗失败后的晚期结直肠癌患者, 因此多为久病体衰、正虚亏耗, 八纲辨证多属于阴证。而 TMB 较高的患者,

往往是瘤体高频突变,此时人体内免疫机制更容易恢复免疫监视清除癌细胞,正气与邪尚可交争,此类患者免治疗效果较好,多属阳证。因此,中医八纲辨证的阴阳一定程度能够与结直肠癌患者的 TMB 相吻合。占晚期肠癌较多的脾肾两虚证及阴证患者 TMB 不占优势,也与目前晚期肠癌免疫治疗获益人群选择性高、疗效不佳的趋势相一致。

通过此次研究我们发现,外周血 ctDNA 状态可以较好地反映化疗失败后晚期结直肠癌患者中医药治疗后分子生物学的特征,同时 KRAS、PIK3CA 等原癌基因的突变可能是这部分患者不良预后及化疗失败、治疗效果不佳的分子生物学致病靶点。通过对脾肾两虚证及阴阳辨证与肿瘤 ctDNA 及突变基因的分析,从分子生物学的角度对中医药治疗恶性肿瘤先后天理论及健脾补肾治则进行了进一步的验证与阐释,脾肾证型与较低的肿瘤突变频率及较低的抑癌基因突变相关、阴证患者 TMB 较低,可能对免疫治疗获益不佳。本研究试图探索中医药治疗晚期结直肠癌化疗失败患者的 ctDNA 状态,为晚期结直肠癌精准治疗提供新方向、新思路。但其尚处于探索阶段,样本量较小,晚期结直肠癌患者病情复杂,中医辨证标准还需进一步细化,结果具有一定局限性,未来还需更大样本进行验证与探索。

参考文献

- [1] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] ZHANG T, YANG YF, HE B, et al. Efficacy and safety of Quxie Capsule (祛邪胶囊) in metastatic colorectal cancer: a double-blind randomized placebo controlled trial [J]. Chin J Integr Med, 2018, 24(3): 13-19.
- [3] World Health Organization. International classification of diseases for oncology, ICD-O [M]. Geneva: World Health Organization (WHO), 2000: 35-36.
- [4] Network National Comprehensive Cancer. NCCN clinical practice guidelines in oncology: colon cancer. V. 1. 2015 [S/OI]. (2015-09-13) [2016-03-20]. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/colon.pdf.
- [5] Network National Comprehensive Cancer. NCCN clinical practice guidelines in oncology: rectal cancer. V. 1. 2015 [S/OI]. (2015-09-13) [2016-03-20]. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/rectal.pdf.
- [6] 国家中医药管理局. 中医病证诊断疗效标准 [S]. 北京: 国家中医药管理局, 1994: 1-9.
- [7] 中华人民共和国卫生部. 中药新药临床研究指导原则 (第三辑) [M]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 1997: 15-17.
- [8] 沈自尹, 王文健. 中医虚证辨证参考标准 [J]. 中国中西医结合杂志, 1986, 6(10): 598.
- [9] 国家中医药管理局重点专科协作组. 结直肠癌中西医结合诊疗方案 [J]. 北京: 国家中医药管理局, 2000: 1-10.
- [10] 邓铁涛. 实用中医诊断学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 180-185.
- [11] HHS, U. S. Department of health and human services, NIH. The national institutes of health, NCI, national cancer institute, common terminology criteria for adverse events (CTCAE) version 4.0. 2009 [S/OI]. (2009-05-02) [2016-03-20]. <http://evs.nci.nih.gov/ftp1/CTCAE/About.html>.
- [12] OSUMI H, SHINOZAKI E, TAKEDA Y, et al. Clinical relevance of circulating tumor DNA assessed through deep sequencing in patients with metastatic colorectal cancer [J]. Cancer Med, 2019, 8(1): 408-417.
- [13] 黄凯斌. 基于二代测序的 ctDNA 检测在结直肠癌诊治中的应用 [J]. 广州: 暨南大学, 2017.
- [14] ELEZ E, CHIANESE C, SANZ-GARCÍA E, et al. Impact of circulating tumor DNA mutant allele fraction on prognosis in RAS-mutant metastatic colorectal cancer [J]. Mol Oncol, 2019, 13(9): 1827-1835.
- [15] WANG Q, SHI YL, ZHOU K, et al. PIK3CA mutations confer resistance to first-line chemotherapy in colorectal cancer [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(7): 739-749.
- [16] KHAKOO S, GEORGIU A, GERLINGER M, et al. Circulating tumour DNA, a promising biomarker for the management of colorectal cancer [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2018, 12(2): 72-82.
- [17] VIDAL J, MUINELO L, DALMASES A, et al. Plasma ctDNA RAS mutation analysis for the diagnosis and treatment monitoring of metastatic colorectal cancer patients [J]. Ann Oncol, 2017, 28(6): 1325-1332.
- [18] CHALMERS ZR, CONNELLY CF, FABRIZIO D, et al. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden [J]. Genome Med, 2017, 9(1): 34-41.
- [19] HELLMANN MD, NATHANSON T, RIZVI H, et al. Genomic features of response to combination immunotherapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer [J]. Cancer Cell, 2018, 33(5): 843-852.
- [20] 张彤, 何文婷, 杨宇飞. 中医药治疗 IV 期结直肠癌中医证候及用药规律文献研究 [J]. 中医杂志, 2017, 58(11): 966-970.

- [1] 葛青云, 陈玉根. 基于现代文献分析大肠癌中医证型及症状、体征分布规律 [J]. 吉林中医药, 2018, 38(6): 625-628.
- [2] 司富春, 岳静宇. 近 30 年大肠癌中医证型和用药规律分析 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(7): 1929-1931.
- [3] 容景瑜, 林丽珠, 林清, 等. 大肠癌中医证候的回顾性研究 [J]. 肿瘤基础与临床, 2020, 28(3): 60-63.
- [4] 邱艳艳, 梁波, 胡送娇, 等. 大肠癌中医证型分布特点的现代文献研究 [J]. 上海中医药大学学报, 2014, 28(6): 52-55.
- [5] 王振祥, 李志刚. 大肠癌的中医证型及理法方药规律研究 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2019, 17(9): 41-43.

Relationship Between Circulating Tumor DNA Status and Prognosis in the Advanced Colorectal Cancer Patients Treated with Traditional Chinese Medicine Syndrome Differentiation and Treatment after Failure of Chemotherapy

QU Qian¹, YANG Guowang², HOU Wei³, SUN Hong⁴, LI Liusheng¹, HAO Tengting¹, CUI Ning¹, LI Zhongyu¹, WU Jiao¹, WU Yu¹

1. Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing, 100091; 2. Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University; 3. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences; 4. Cancer Hospital of Peking University

ABSTRACT Objective To explore the relationship between circulating tumor DNA (ctDNA) state, mutation gene and prognosis in patients with advanced colorectal cancer after failure of chemotherapy. **Methods** Collect 10 ml of peripheral blood of 83 patients with advanced colorectal cancer who failed to receive chemotherapy, and customized Geneseq one NGS panel covering 416 tumor related gene probes were used to hybridize and enrich. After highly efficient capture, polymerase chain reaction (PCR) amplification was carried out, and the target enriched library was sequenced on the hillseq ngs platform (Illumina). **Results** Among 83 patients with advanced colorectal cancer after chemotherapy failure, tumor related mutations were found in 54 (65.06%) patients, involving a total of 152 genes. The top 20 genes including APC, TP53, KRAS, PIK3CA, etc. were screened according to the mutation frequency, ctDNA mutation frequency, tumor mutation burden (TMB), KRAS and PIK3CA were significantly correlated with prognosis ($P < 0.05$). Clinical correlation analysis showed that liver metastasis was strongly correlated with multiple undesirable mutations in tumor genes ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). There was a significant correlation between spleen kidney deficiency syndrome and ctDNA mutation frequency, TMB, TP53 ($P < 0.05$), and there was a significant correlation between *yin* syndrome, *yang* syndrome in eight syndrome differentiation and TMB ($P < 0.05$). **Conclusion** Peripheral blood ctDNA can well reflect the molecular biological status of patients with advanced colorectal cancer after chemotherapy failure by TCM syndrome differentiation treatment. Spleen-kidney deficiency syndrome is related to lower ctDNA mutation frequency and lower tumor suppressor gene mutation. Patients with *yin* syndrome have lower TMB and patients with *yang* syndrome have higher TMB.

Keywords advanced colorectal cancer; traditional Chinese medicine therapy; chemotherapy; circulating tumor DNA; deficiency syndromes of spleen and kidney; tumor mutation burden

(收稿日期: 2020-03-02; 修回日期: 2020-06-25)

编辑: 叶晨