

分子预测直肠癌新辅助放化疗后 pCR 的研究进展

李春波, 刘彦龙, 崔滨滨

(哈尔滨医科大学附属肿瘤医院, 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要:局部晚期直肠癌(LARC)目前的基本治疗策略是新辅助放化疗(nCRT)和随后的全直肠系膜切除术(TME)。nCRT后的肿瘤消退在个体间差异显著,病理完全缓解(pCR)是LARC的预后因素。明确放化疗反应的预测因素有助于临床医生鉴别可能从多模式治疗中获益的患者,并在早期对其预后进行评估。本文结合近年的相关研究,探讨LARC在新辅助治疗后可能达到pCR的分子预测因子。

关键词:直肠肿瘤;新辅助放化疗;病理完全缓解;分子预测因子

中图分类号:R735.377 **文献标识码:**A **文章编号:**1671-170X(2019)12-01025-06

doi:10.11735/j.issn.1671-170X.2019.12.B001

Research Progress on Molecular Prediction of pCR after Neoadjuvant Chemoradiation for Rectal Cancer

LI Chun-bo, LIU Yan-long, CUI Bin-bin

(Harbin Medical University Cancer Hospital, Harbin 150081, China)

Abstract: The current primary treatment strategy for locally advanced rectal cancer (LARC) includes neoadjuvant chemoradiation (nCRT) with subsequent total mesorectal excision. Tumor regression after nCRT varies substantially among individuals and pathological complete response (pCR) is a known prognostic factor for LARC. The identification of predictive factors for response to chemoradiotherapy would help clinicians to identify patients who would probably benefit from multimodal treatment and to perform an early assessment of individual prognosis. This article reviews recent studies to explore molecular predictors of pCR after neoadjuvant therapy for LARC patients.

Subject words: neoadjuvant chemoradiation; rectal cancer; pathologic complete response; molecular predictors

直肠癌是最常见的恶性肿瘤之一。自2004年以来, $\geq cT3$ 或任何区域淋巴结受累的患者应接受nCRT,其可减少局部复发并降低急性毒性^[1]。在接受nCRT的患者中,肿瘤对nCRT的反应不同^[2]。一些患者在nCRT后达到pCR,在手术切除后病理检查未发现肿瘤;另一部分患者表现出部分缓解(PR)或无反应(NR)^[3]。nCRT后pCR患者与PR、NR患者相比有更低的远期复发率,更好的5年生存率(OS)和无病生存率(DFS)^[4]。

若能确定nCRT后pCR的预测因子对LARC的治疗具有重大意义。首先,术前可以通过预测因子

预测nCRT临床反应强烈的患者(cCR患者)获得pCR的可能性,获得pCR可能性大的患者可以选择观察和等待策略(WW),而非手术治疗^[5]。评估cCR的方式包括直肠指检(DRE),电子结肠镜和直肠核磁^[6]。就当前pCR只能手术切除术后通过病理学诊断。cCR和pCR之间的联系也就决定了患者是否接受手术治疗。另一方面,提前预测nCRT后可能达到pCR的患者,可以接受微创手术,并且能很好的保留括约肌功能^[7]。nCRT后达到PR的患者,肿瘤局部退缩并可以接受保留括约肌切除术治疗。肿瘤局部退缩者有机会接受低位前切除术(LAR)与腹部会阴切除术(APR),达到R0切除。此外,如果能够预测对nCRT反应不佳患者,这部分患者将立即进行手术切除,从而避免nCRT的成本和潜在毒性。

通信作者:崔滨滨,主任,主任医师,博士;哈尔滨医科大学附属肿瘤医院结直肠外科一病区,黑龙江省哈尔滨市南岗区哈平路150号(150081);E-mail:13351112888@163.com

收稿日期:2019-07-26; **修回日期:**2019-09-08

因此,预测 LARC 患者 nCRT 后能否达到 pCR, 对于临床治疗选择至关重要。当前 LARC nCRT 后 pCR 分子预测因子主要包括: KRAS、BRAF、MSI、TP53、p53、p21、EGFR、VEGF、HER-2、Bax、PIK3CA、APC 和 miRNA 等, 以下就近期研究较热门的分子因素, 分别从 DNA 改变、蛋白表达以及 miRNA 三方面进行总结。

1 DNA 改变

1.1 KRAS

KRAS 突变(最常见于密码子 12 或 13)发生在 40% 的局部晚期直肠癌(LARC)中。RAS 基因突变后, 抑制了其内在的 GTP 酶活性, 使 KRAS 蛋白一直处于活化状态。激活的 RAS 蛋白通过激活细胞内不同的蛋白质, 引起细胞持续生长, 从而发生癌变^[8]。大量研究证明 KRAS 基因突变与某些抗表皮生长因子受体(EGFR)药物的抗性相关^[9], 然而, 其作为 CRT 反应的生物预测标志物的作用尚不明确。Peng 等^[10]研究分析了 70 例(其中 25 例 KRAS 突变)临床 T₃₋₄ 和/或 N+ 的 LARC 患者, 术前均接受两周期 XELOX 方案和总剂量为 50Gy 的放化疗, 随后 6~8 周内行手术治疗。结果显示 45 例野生型 KRAS 中有 34 例(75.6%)在 CRT 后肿瘤明显消退(TRG 0 或 TRG 1), 突变 KRAS 仅有 13 例(52.0%)可检测肿瘤消退反应 ($P=0.044$)。多变量逻辑回归分析表明 KRAS 突变与 CRT 后的肿瘤消退独立相关 (OR=0.332, 95%CI: 0.112~0.982, $P=0.046$)。突变型 KRAS 患者与野生型 KRAS 患者相比有较低的 3 年 DFS 率($P=0.016$)和 3 年 OS 率($P=0.020$)。Chow 等^[11]研究也证明了 KRAS 突变与较低的 pCR 率独立相关 ($P<0.01$)。并且有研究已经证实了 KRAS 突变亚型与 LARC 治疗结果有一定相关性。Abdul-Jalil 等^[12]发现, 与 KRAS 野生型肿瘤相比, KRAS 密码子 12 (G12D, G12V 和 G12S) 和密码子 13 (G13D) 突变与更差的 DFS 明显相关。Martellucci 等^[13]也发现具有 KRAS 密码子 13 突变的 LARC 患者对 nCRT 具有抗性, 有更低的 pCR 率。Gaedeke 等^[14]报道, 与 G13D 突变相比, KRAS G12V 突变与肿瘤消退率增加有关($P=0.012$), KRAS G12D 突变患者的 3 年 OS 较未发生突变患者差(71.4% vs 95.1%, $P=0.028$)。这可能是不同的 KRAS 突变亚型在激活信号转导途径

的能力不同, 或者可能激活了不同的途径引起的。然而, Lee 等^[15]发现 KRAS 突变状态与直肠癌的治疗反应或术后预后无关。上述研究虽然表明 KRAS 基因状态是一种有前景的生物标志物, 但需要进一步研究 KRAS 突变及其突变亚型。

1.2 BRAF

BRAF 是 MAPK 途径的一部分, MAPK 信号传导途径存在于所有真核细胞中。BRAF 中的 V600E 突变导致该信号传导途径即使在无细胞因子、激素或生长因子刺激的情况下也被激活, 导致不受调节的细胞增殖并最终导致癌症^[16]。Jiang 等^[17]收集了 74 例临床 II/III 期 LARC 患者, 术前均接受 XELOX 或改良 FOLFOX-6 (mFOLFOX-6) 1~4 个周期, 随后接受 45~50.4Gy 的放射治疗伴 xeloda 或 5-Fu 同步化疗, 其中 4 例患者(5.4%) BRAF 突变, nCRT 后 1 例达到 TRG 2 (中等反应), 3 例达到 TRG 3 (反应较差)。TRG 3 (3/12, 25%) 中 BRAF 突变与 TRG 0~2 (1/62, 1.6%) 相比, 发现 TRG 3 肿瘤中 BRAF 基因的更高突变频率 ($P=0.012$)。BRAF 突变的 LARC 患者有更短的 PFS ($P=0.045$) 和 OS ($P<0.001$)。Venderbosch 等^[18]同样验证了 BRAF 突变型患者有更差的 PFS 和 OS (HR=1.34, 95%CI: 1.17~1.54; HR=1.91, 95%CI: 1.66~2.19)。Girolamo 等^[19]通过研究不同 BRAF 基因类型肠癌在电离辐射下细胞凋亡率评估放射敏感性, 分析得出 BRAF V600E 突变的患者细胞对放化疗不敏感。然而就目前研究显示 BRAF 突变状态对 nCRT 反应的影响尚未达成共识。直肠癌 BRAF 突变率只有 2%~6%, 临床样本量小, 在这样的背景下, 我们已确定 BRAF V600E 突变的结直肠癌患者对标准化疗药物反应性差^[20]。BRAF 突变是否会增强直肠癌细胞的凋亡阈值以及对辐射反应的影响这一问题极为重要, 是进一步的研究对象。

1.3 微卫星不稳定 (MSI)

MSI 约占直肠癌的 2%~8%, 是 CRCSC 分子亚型的另一个标志^[21]。MSI 由 DNA 错配修复系统缺陷 (deficiency of mismatch-repair, dMMR) 引起, 表现为简单 DNA 序列的重复导致的微卫星不稳定状态, 进而诱发肿瘤^[22]。其机制包括: MLH1 基因启动子部位的甲基化以及错配修复基因的遗传突变。与结直肠癌有关的 MMR 主要有 PMS2、MLH1、MSH2 和 MSH6。MSI 在预测肠癌患者预后及化疗反应方面也有重要作用。然而, 其在 nCRT 治疗反应中的作用尚存争

议。Hasan 等^[23] 回顾了 5086 例 LARC 患者, 4450 例 MSI 阴性(-)、636 例 MSI 阳性(+), 所有患者均接受 nCRT 和手术治疗。437 例 (8.6%) 达到 pCR, 患者 MSI(-) 率为 8.9%, MSI(+) 率为 5.9% (OR=0.65, $P=0.01$)。随着肿瘤的降期, MSI(+) 与患者较低 pCR 率明显相关 (OR=0.65, 95% CI: 0.43~0.96)。MSI(+) 患者是低 pCR 率的独立预测因子, 且证实了 MSI(+) 肿瘤对新辅助放化疗存在抗性。常静等^[24] 收集了临床 III/IV 期结直肠癌患者 72 例, 术前均接受 FOLFOX6 方案化疗, 化疗前 MSI 者为 19.4%, 较微卫星稳定 (microsatellite stability, MSS) 者有更好的新辅助化疗疗效 ($P<0.001$)。Huh 等^[25] 在了一项前瞻性研究中, 收集整理了 209 例临床 T₃/T₄ 和/或 N+LARC 患者并接受 nCRT, 术后经病理学评估; 30 例 (14.4%) 达到 pCR, pCR 和非 pCR 组间, MLR1 ($P=0.829$)、MSH2 ($P=0.224$) 和 MSH6 ($P=0.118$) 的表达水平均无明显差异; 多变量分析显示 nCRT 前 MSH6 表达是 OS 的独立预测因子 ($P=0.020$), nCRT 后 MSH6 表达是 RFS 的独立预测因子 ($P=0.035$); 此外, 在 nCRT 前 MSH2 的高表达预示着更好的 DFS (单变量分析 $P=0.014$, 多变量分析 $P=0.066$)。该研究表明 nCRT 前后 MMR 蛋白的表达, 特别是 MSH6 的表达可能可预测 LARC 患者 nCRT 的预后, 但能否从 nCRT 中获益缺乏预测价值。虽有部分研究表明 MSI 与化疗反应和总体预后有关^[26], 但仍缺乏 MSI 与 nCRT 敏感性及其治疗后病理反应之间关系的数据评估。在 II~III 期结直肠癌中, 微卫星状态和 MMR 蛋白对新辅助治疗是否有指导意义、新辅助化疗对微卫星状态和 MMR 蛋白表达是否有影响均无明确结论, 还需临床研究进一步确认。

2 蛋白质表达

2.1 p53

野生型 p53 基因属于抑癌基因, 其编码的蛋白质是一种能够调节细胞周期启动的转录因子, 起着减慢或监视正常细胞分裂的作用。p53 基因突变后, 由于其空间构象等基本结构发生了改变, 使其在细胞生长、凋亡及 DNA 修复等方面失去作用, 从而导致细胞凋亡与增殖的不平衡生长, 继而导致肿瘤发生^[27]。p53 一直是直肠癌最常研究的反应指标。Yilmaz Rakici 等^[28] 收集了 37 例 LARC (临床 T₃/T₄)

患者, 术前均接受新辅助治疗, 治疗前进行 p53 状态分析, 发现 nCRT 后有较好病理反应患者的 p53 突变率较高, 但差异无统计学意义 ($P=0.380$)。一项研究提出, 在预测对 nCRT 的病理反应时, p21 表达比 p53 表达更加有效准确^[29]。另一项研究表明野生型 p53 的低表达与接受新辅助放射治疗 LARC 患者的病理反应相关 (良好反应: RR=1.30, 95% CI=1.14~1.49, $P<0.001$; 完全响应: RR=1.65, 95% CI=1.19~2.30, $P=0.003$; 反应差: RR=0.85, 95% CI=0.75~0.96, $P=0.007$)^[30]。尽管上述部分研究表明, p53 是一种重要的调节因子, 但其在预测新辅助治疗反应方面尚存在争议, 需要更大样本量试验进一步研究。

2.2 表皮生长因子受体 (EGFR)

EGFR 是 Erb-B 家族蛋白成员之一, 又称为 Erb-B1 或 HER-1 受体。EGFR 与其配体结合后形成同源二聚体, 也可与其它 TK 受体形成异源二聚体, 导致胞内 TK 区激活, 启动一系列级联反应, 将信号传到细胞核内, 最终引起一系列相关基因活化, 在肿瘤发生发展过程中发挥重要作用^[31]。Kundel 等^[32] 对 47 例 T₃ 和/或 N+LARC 患者进行研究, 术前均接受 nCRT。术后通过 TRG 评估 CRT 的反应, 13 例 (27%) 达到 TRG 1 (pCR), 5 例 (11%) 达到 TRG 2, 15 例 (32%) 达到 TRG 3, 14 例 (30%) 达到 TRG 4。nCRT 前 EGFR 基因阳性 31 例 (66%)。TRG 1/TRG 2 与 TRG 3/TRG 4 相比, EGFR 阳性表达率分别为 29.17%±7.02% 和 9.48%±2.8% ($P<0.005$)。TRG 1 与 TRG 2~4 相比, EGFR 的阳性表达率分别为 33.08%±7.87% 和 11.21%±3.2% ($P<0.003$)。研究说明: LARC 患者 nCRT 前 EGFR 的高表达可作为 pCR 的预测因子。在另一研究中 Sole 等^[33] 证明了 EGFR 高表达的 LARC 患者 nCRT 后更有可能达到肿瘤降期 ($P=0.04$), 但与 OS 和 DFS 无关 (P 均 >0.05)。然而 Richter 等^[34] 的研究表明, EGFR 高表达的 LARC 患者对 nCRT 的敏感性降低, 且 OS 和 DFS 明显缩短。但 Yu 等^[35] 研究了 31 例临床 T₃₋₄ 期 LARC 患者, 术前均接受 CRT。多变量分析发现 EGFR 表达与 pCR 无相关性 ($P>0.05$)。尽管上述部分研究表明, 对 LARC 的 EGFR 表达的检测可以预测 nCRT 疗效及预后, 且有助于鉴定从 nCRT 中获益的患者, 但也存在争议, 因此还需临床前瞻性大样本研究分析 EGFR 与直肠癌新辅助放化疗敏感性的相关性。

2.3 血管内皮生长因子(VEGF)

VEGF在血管、淋巴管生成过程中占有重要地位, VEGF家族由VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E及胎盘生长因子(PIGF)组成。VEGF-A即是我们通常所指的VEGF,它可以诱导血管内皮细胞的增殖和迁移,是生理及病理性血管生成过程中必不可少的生长因子。VEGF-A基因在很多肿瘤中表达上调,并且其表达产物与肿瘤分期和进展关系密切^[36]。Buka等^[37]回顾性分析了53例临床II/III期LARC患者,术前均接受总剂量50.4Gy放疗和输注5-氟尿嘧啶化疗,nCRT后34例患者(64%)肿瘤获得降期;术后标本中24例患者(45%)VEGF表达减少,7例患者(13%)VEGF表达增加,20例患者(38%)未发生变化,2例因达到pCR无法评估变化。nCRT后VEGF表达的降低不能预测治疗反应和肿瘤下降($P=0.61$)。我们观察到VEGF表达对nCRT的差异反应,在大多数患者中观察到表达降低。但Yu等^[35]研究了31例临床T₃₋₄期LARC患者,术前均接受CRT,CRT前通过免疫组织化学评估VEGF,31例患者中26例VEGF阳性,多因素回归分析显示VEGF表达是CR的重要预测因子($P=0.001$)。多数研究认为VEGF表达降低与较差的生存率相关,VEGF表达与nCRT疗效及预后的关系需进一步研究。

2.4 HER-2

HER-2基因编码具有蛋白酶激酶活性的细胞膜糖蛋白,参与对细胞生长、繁殖、分裂的调控及控制肿瘤的生长,其结构的改变、扩增、过度表达将促进细胞有丝分裂。HER-2单体本身并没有活性,需要依赖小分子的配体和受体的结合,形成二聚体才能产生活化信号,可促使细胞发生恶性转化。目前还没有发现可以和HER-2直接结合的配体,但HER-2与其他受体结合成异二聚体后能发挥信号转导功能,与不含HER-2的二聚体相比其信号更强;另一方面,HER-2的异二聚体使EGFR在细胞膜过表达,加速了细胞的增殖,导致肿瘤形成和生长加快。Kwon等^[38]研究了74例LARC患者,术前患者均接受总剂量45.0~50.4Gy放疗和基于5-氟尿嘧啶(5-Fu)的化疗,治疗后42例患者(56.8%)实现肿瘤降期。通过IHC和SISH评估:HER-2阳性率为17.6%,经分析HER-2阳性与临床病理反应或预后无关。多变量分析显示,年龄较大(≥ 61 岁)($P=0.028$)和

HER-2阳性($P=0.035$)是肿瘤非降期的独立预测因子。Park等^[39]也得出与之相同的结论。Meng等^[40]也认为HER-2状态无法预测nCRT后肿瘤降期($P=0.210$)和肿瘤消退等级($P=0.085$),但HER-2阳性肿瘤可能对nCRT具有抗性,有更差的5年DFS($P=0.015$)和5年OS($P=0.026$)。近年来,HER-2在直肠癌中的作用尚没有统一的定论,但影响患者生存率的重要原因为术后复发及转移,如果HER-2对直肠癌的研究在组织、分子水平上有进一步进展,将为靶向HER-2相关分子的药物以取得肿瘤的抑制、减少肿瘤的复发、转移,提高患者生存率提供了可能。HER-2在直肠癌中的表达及意义,需要更多的研究去确定其独立的预后意义。

3 微小核糖核酸(miRNA)

miRNA是一种含有21~23个碱基的单链小分子RNA,研究发现多种miRNA的过度表达和沉默,编码miRNA的基因转录激活和扩增可导致某些miRNA的表达上调,而由于染色体的缺失和生成过程中的缺陷可以导致某些miRNA的表达下调和沉默^[41]。miRNA可以通过调控影响结直肠癌肿瘤生成通路的相关蛋白进而影响结直肠癌的增殖。miRNA还可以通过影响细胞外基质降解和上皮间质转化以及PI3K-AKT-mTOR和TGF- β 信号通路进而影响肿瘤的侵袭和转移。Campayo等^[42]研究了96例临床T_{3/4}和/或N₊的LARC患者,术前均接受5-Fu输注和总剂量45~50Gy的放化疗,nCRT完成后6~8周后均行手术治疗。选择其中6例完全消退患者和6例无反应或轻微反应患者,在筛选阶段,鉴定了8个miRNA与CRT反应有关:let-7b,let-7e,miR-21,miR-99b,miR-183,miR-328,miR-375和miR-483-5p,其中miR-21($P=0.0127$)、miR-99b($P=0.0049$)和miR-375($P=0.0039$)的低水平表达与nCRT后更好的病理反应明显相关,高miR-328表达($OR=4.340$, $P=0.004$)和低let-7e($OR=6.196$, $P=0.001$)表达可以作为DFS的独立预后标志物,与肿瘤降期也存在明显相关性($OR=0.182$, $P<0.003$),高miR-328($OR=3.905$, $P=0.047$)表达和低let-7e($OR=3.678$, $P=0.044$)表达是OS的独立影响因素。Du等^[43]研究显示,miR-548c-5p,miR-548d-5p和miR663a在直肠癌患者对nCRT的反应中有预测作用。Eriksen等^[44]认

为 miRNA 的表达与 OS 和 DFS 无明显相关性,miR-21 的高表达与较好的肿瘤反应明显相关 ($P=0.035$),miR-145 低表达与较好病理反应明显相关,但没有达到统计学意义 ($P=0.085$),miR-125b 和 miR-145 低表达者有更好的 DFS。越来越多的证据表明,miRNA 在直肠癌的 nCRT 中起着重要作用。然而,关于预测 pCR 或 cCR 的 miRNA 研究尚未达成共识。这是由于许多复杂因素造成的,且多数研究的研究对象 <50 例,在小群体的调查中,结果假阳性的风险很高,仍需要更大的临床样本量进一步研究验证。

4 小 结

LARC 患者进行 nCRT 的治疗策略已有十余年,尽管已经提出许多分子生物标志物作为 nCRT 反应的预测因子,但它们都没有应用于临床实践,这可能归因于对分子生物标志物研究方法存在差异,首先,大多数研究只评估一种生物标志物,未联合考虑其他标志物的差异表达。其次,治疗方案存在明显差异,包括化疗方案、放射剂量、nCRT 与手术之间的间隔,这可能导致对 nCRT 产生不同的反应。并且使用不同 TRG 系统也可能是研究中的潜在偏差。

目前为止,对癌症中治疗反应预测的大多数研究只关注单个或有限的分子标志物,但与反应治疗效果的单个分子标志物相比,一组分子标志物可能更可靠。更重要的是,准确的预测很困难,因为个体生物标志物难以揭示系统生物学水平的癌症进化过程。因此,在接下来的研究中,需要进行更大样本量研究以确认既往研究的结果,并获得新的结果从而更好地指导临床实践。

参考文献:

- [1] Sauer R,Becker H,Hohenberger W,et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer [J]. *N Engl J Med*,2004,351(17):1731-1740.
- [2] Patel SV,Roxburgh CS,Vakiani E,et al. Distance to the anal verge is associated with pathologic complete response to neoadjuvant therapy in locally advanced rectal cancer [J]. *J Surg Oncol*,2016,114(5):637-641.
- [3] Huerta S,Hrom J,Gao X,et al. Tissue microarray constructs to predict a response to chemoradiation in rectal cancer[J]. *Dig Liver Dis*,2010,42(10):679-684.
- [4] Zorcolo L,Rosman AS,Restivo A,et al. Complete pathologic response after combined modality treatment for rectal cancer and long-term survival:a meta-analysis [J]. *Ann Surg Oncol*,2012,19(9):2822-2832.
- [5] Habr-Gama A,Perez R O,Nadalin W,et al. Operative versus nonoperative treatment for stage 0 distal rectal cancer following chemoradiation therapy:long-term results[J]. *Ann Surg*,2004,240(4):711-717.
- [6] Glynne-Jones R,Harrison M,Hughes R. Challenges in the neoadjuvant treatment of rectal cancer:balancing the risk of recurrence and quality of life [J]. *Cancer Radiother*,2013,17(7):675-685.
- [7] São Julião GP,Habr-Gama A,Vailati BB,et al. New strategies in rectal cancer[J]. *Surg Clin North Am*,2017,97(3):587-604.
- [8] Brand TM,Wheeler DL. KRAS mutant colorectal tumors: past and present[J]. *Small GTPases*,2012,3(1):34-39.
- [9] Normanno N,Tejpar S,Morgillo F,et al. Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC[J]. *Nat Rev Clin Oncol*,2009,6(9):519-527.
- [10] Peng J,Lin J,Qiu M,et al. Oncogene mutation profile predicts tumor regression and survival in locally advanced rectal cancer patients treated with preoperative chemoradiotherapy and radical surgery [J]. *Tumour Biol*,2017,39(7):1010428317709638.
- [11] Chow OS,Kuk D,Keskin M,et al. KRAS and combined KRAS/TP53 mutations in locally advanced rectal cancer are independently associated with decreased response to neoadjuvant therapy [J]. *Ann Surg Oncol*,2016,23(8):2548-2555.
- [12] Abdul-Jalil KI,Sheehan KM,Toomey S,et al. The frequencies and clinical implications of mutations in 33 kinase-related genes in locally advanced rectal cancer:a pilot study[J]. *Ann Surg Oncol*,2014,21(8):2642-2649.
- [13] Martellucci J,Alemanno G,Castiglione F,et al. Role of KRAS mutation as predictor of pathologic response after neoadjuvant chemoradiation therapy for rectal cancer[J]. *Updates Surg*,2015,67(1):47-53.
- [14] Gaedcke J,Grade M,Jung K,et al. KRAS and BRAF mutations in patients with rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy[J]. *Radiother Oncol*,2010,94(1):76-81.
- [15] Lee JW, Lee JH,Shim BY,et al. KRAS mutation status is not a predictor for tumor response and survival in rectal cancer patients who received preoperative radiotherapy with 5-fluoropyrimidine followed by curative surgery [J]. *Medicine (Baltimore)*,2015,94(31):e1284.
- [16] Karnoub AE,Weinberg RA. Ras oncogenes:split personalities[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*,2008,9(7):517-531.
- [17] Jiang D,Wang X,Wang Y,et al. Mutation in BRAF and SMAD4 associated with resistance to neoadjuvant chemoradiation therapy in locally advanced rectal cancer [J]. *Virchows Arch*,2019,475(1):39-47.
- [18] 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.
- [19] Spagnoletti G,Li Bergolis V,Piscazzi A,et al. Cyclin-dependent kinase 1 targeting improves sensitivity to radiation in BRAF V600E colorectal carcinoma cells [J]. *Tumour Biol*,2018,40(4):1010428318770957.
- [20] Maurel J,Postigo A. Prognostic and predictive biomarkers in colorectal cancer. From the preclinical setting to clinical practice[J]. *Curr Cancer Drug Targets*,2015,15(8):703-715.
- [21] Roepman P,Schlicker A,Taberero J,et al. Colorectal cancer intrinsic subtypes predict chemotherapy benefit, deficient mismatch repair and epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *Int J Cancer*,2014,134(3):552-562.
- [22] Kim JH,Kang GH. Molecular and prognostic heterogeneity of microsatellite-unstable colorectal cancer[J]. *World J Gastroenterol*,2014,20(15):4230-4243.
- [23] Hasan S,Renz P,Wegner RE,et al. Microsatellite instability (MSI) as an independent predictor of pathologic complete response (PCR) in locally advanced rectal cancer:a national cancer database (NCDB) analysis[J]. *Ann Surg*,2018 Sep 13. [Epub ahead of print]
- [24] Chang J,Liu JH,Qiang L,et al. Correlation between mismatch repair genes in colorectal cancer and neoadjuvant chemotherapy [J]. *Chinese Journal of Cancer Prevention and Treatment*,2018,25(14):1003-1008. [常静,刘继红,强玲,等.结直肠癌新辅助化疗与微卫星不稳定相关性研究[J].*中华肿瘤防治杂志*,2018,25(14):1003-1008.]
- [25] Huh JW,Kim HC,Kim SH,et al. Mismatch repair gene expression as a predictor of tumor responses in patients with rectal cancer treated with preoperative chemoradiation[J]. *Medicine (Baltimore)*,2016,95(3):e2582.
- [26] Nazemalhosseini Mojarad E,Kashfi SM,Mirtalebi H,et al. Low level of microsatellite instability correlates with poor clinical prognosis in stage II colorectal cancer patients[J]. *J Oncol*,2016,2016:2196703.
- [27] Liu J,Zhang C,Feng Z. Tumor suppressor p53 and its gain-of-function mutants in cancer [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*,2014,46(3):170-179.
- [28] Yilmaz Rakici S,Bedir R,Hatipoğlu C. Are there predictors that can determine neoadjuvant treatment responses in rectal cancer?[J]. *Turk J Gastroenterol*,2019,30(3):220-227.
- [29] Stojanovic-Rundic S,Jankovic R,Micev M,et al. p21 does, but p53 does not predict pathological response to preoperative chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer[J]. *J Buon*,2017,22(6):1463-1470.
- [30] Chen MB,Wu XY,Yu R,et al. P53 status as a predictive biomarker for patients receiving neoadjuvant radiation-based treatment:a meta-analysis in rectal cancer.[J]. *PLoS One*,2012,7(9):e45388
- [31] Molinari C,Matteucci F,Caroli P,et al. Biomarkers and molecular imaging as predictors of response to neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with locally advanced rectal cancer[J]. *Clin Colorectal Cancer*,2015,14(4):227-238.
- [32] Kundel Y,Nasser NJ,Rath-Wolfson L,et al. Molecular predictors of response to neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer[J]. *Am J Clin Oncol*,2018,41(6):613-618.
- [33] Sole CV,Calvo FA,Alvarez E,et al. Metabolic and molecular relative percentage coreduction in patients with locally advanced rectal cancer treated with neoadjuvant therapy[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*,2016,43(8):1444-1452.
- [34] Richter I,Dvořák J,Urbanc M,et al. The prognostic significance of tumor epidermal growth factor receptor (EGFR) expression change after neoadjuvant chemoradiation in patients with rectal adenocarcinoma [J]. *Contemp Oncol (Pozn)*,2015,19(1):48-53.
- [35] Yu J, Lee SH,Jeung TS,et al. Expression of vascular endothelial growth factor as a predictor of complete response for preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer [J]. *Medicine (Baltimore)*,2019,98(26):e16190.
- [36] Zheng Y,Hao Z,Ding Y,et al. Expression of delta-like 4 (Drosophila) and vascular endothelial growth factor A in colon cancer and association with tumour angiogenesis[J]. *J Int Med Res*,2015,43(4):535-543.
- [37] Buka D,Dvorak J,Sitorova V,et al. The changes of tumour vascular endothelial growth factor expression after neoadjuvant chemoradiation in patients with rectal adenocarcinoma[J]. *Contemp Oncol (Pozn)*,2017,21(1):48-53.
- [38] Kwon MJ,Soh JS,Lim SW,et al. HER2 as a limited predictor of the therapeutic response to neoadjuvant therapy in locally advanced rectal cancer [J]. *Pathol Res Pract*,2019,215(5):910-917.
- [39] Park JS,Yoon G,Kim HJ,et al. HER2 status in patients with residual rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy;the relationship with molecular results and clinicopathologic features[J]. *Virchows Arch*,2018,473(4):413-423.
- [40] Meng X,Wang R,Huang Z,et al. Human epidermal growth factor receptor-2 expression in locally advanced rectal cancer:association with response to neoadjuvant therapy and prognosis[J]. *Cancer Sci*,2014,105(7):818-824.
- [41] Rossi S,Kopetz S,Davuluri R,et al. MicroRNAs, ultraconserved genes and colorectal cancers[J]. *Int J Biochem Cell Biol*,2010,42(8):1291-1297.
- [42] Campayo M,Navarro A,Benítez JC,et al. miR-21,miR-99b and miR-375 combination as predictive response signature for preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer[J]. *PLoS One*,2018,13(11):e0206542.
- [43] Du B,Wang X,Wu D,et al. MicroRNA expression profiles identify biomarkers for predicting the response to chemoradiotherapy in rectal cancer [J]. *Mol Med Rep*,2018,18(2):1909-1916.
- [44] Eriksen AHM,Sørensen FB,Andersen RF,et al. Association between the expression of microRNAs and the response of patients with locally advanced rectal cancer to preoperative chemoradiotherapy [J]. *Oncol Lett*,2017,14(1):201-209.