

## 错配修复基因蛋白在结直肠癌诊治中的临床应用\*

邱春华<sup>①</sup> 张志宏<sup>①</sup> 董丹丹<sup>②</sup> 李良平<sup>①</sup>

**摘要** 目的:探讨错配修复基因(mismatch repair gene, MMR)蛋白 MLH1、MSH2、MSH6、PMS2 在结直肠癌中的表达及在临床中的应用。方法:选取四川省人民医院2015年1月至2016年9月收治的607例结直肠癌患者,采用免疫组织化学法检测手术标本中MMR蛋白的表达情况,研究其与临床病理学的关系,并评价其在Lynch综合征和散发性结直肠癌筛查中的价值。结果:607例患者中MMR表达缺失率为35.58%。MMR蛋白表达缺失的阴性组与表达正常的阳性组,在年龄、性别、肿瘤大小、P53、CD34、D2-40的比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ );两组患者在肿瘤位置、分化程度、TNM分期、淋巴结转移、VEGF、Ki-67的比较,差异均有统计学意义( $P<0.05$ )。联合检测MLH1、MSH2、PSM2、MSH6蛋白可以作为初步筛选Lynch综合征患者的方法。结论:对结直肠癌患者的手术标本进行MMR检测,筛查Lynch综合征患者和家族成员,进行管理干预,可降低部分人群患结直肠癌的风险。

**关键词** 错配修复基因 结直肠癌 Lynch综合征 临床病理

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2018.19.516

### Expression and clinical significance of mismatch repair gene in colorectal cancer

Chunhua Qiu<sup>1</sup>, Zhihong Zhang<sup>1</sup>, Dandan Dong<sup>2</sup>, Liangping Li<sup>1</sup>

Correspondence to: Zhihong Zhang; E-mail: 719446514@qq.com

<sup>1</sup>Department of Gastroenterology, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China; <sup>2</sup>Department of Pathology, Sichuan Academy of Medical Sciences & Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, China

This work was supported by Research Projects of Health Care for Cadres in Sichuan Province (No.2017-212)

**Abstract Objective:** To investigate the expression and clinical significance of mismatch repair genes (MMR) MLH1, MSH2, MSH6, and PMS2 in colorectal carcinoma. **Methods:** Colorectal cancer tissues, collected from 607 patients enrolled in Sichuan Provincial People's Hospital from January 2015 to September 2016, were assigned into two groups based on whether the samples were positive or negative for MMR expression to determine the relationship between MMR expression and clinicopathology. We then evaluated the diagnostic value of MMR expression in the screening of Lynch syndrome and sporadic colorectal cancer. **Results:** The deletion rate of MMR protein was 35.58%. No statistically significant difference in age, sex, tumor size, P53, CD34, and D2-40 expression was detected between the negative group with MMR protein deficiency and the positive group with normal expression ( $P>0.05$ ). Differences in tumor location, differentiation, TNM stage, lymph node metastasis, and VEGF and Ki-67 expression between the two groups were statistically significant ( $P<0.05$ ). The combined detection of MLH1, MSH2, PSM2, and MSH6 proteins may serve as a simple and economical method for screening patients with Lynch syndrome. **Conclusions:** The risk of colorectal cancer can be reduced by MMR detection of surgical specimens from colorectal cancer patients, screening of patients with Lynch syndrome and their family members, and assisting with proper management and intervention.

**Keyword:** mismatch repair gene (MMR), colorectal cancer, Lynch syndrome, clinicopathology

结直肠癌是中国常见的恶性肿瘤,其发病率和死亡率分别位居第3位和第5位<sup>[1-2]</sup>。研究发现,DNA错配修复基因(mismatch repair gene, MMR)的突变或甲基化,导致微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI),是结直肠癌发生的重要机制之一<sup>[3]</sup>。占结直肠癌3%~5%的Lynch综合征是由于MMR发生胚系突变所致的常染色体显性遗传性疾病。而在15%散发性结直肠癌中,错配修复基因MLH1启动子甲基化失活是其主要的发生机制,临床特征与Lynch综合

征相似。2014年美国国家综合癌症网络(NCCN)推荐初诊结直肠癌患者应筛查Lynch综合征<sup>[3]</sup>。

本研究采用免疫组织化学法检测结直肠癌患者手术标本中MMR的表达情况,及其与临床病理学的关系,并评价其在Lynch综合征和散发性结直肠癌筛查中的价值,以期为临床筛查Lynch综合征提供简便、快速、经济的检测方法。

#### 1 材料与方法

##### 1.1 材料

作者单位:①四川省医学科学院·四川省人民医院消化内科(成都市610072);②病理科

\*本文课题受四川省干部保健科研项目(编号:2017-212)资助

通信作者:张志宏 719446514@qq.com

1.1.1 病例资料 选取四川省人民医院 2015 年 1 月至 2016 年 9 月收治的结直肠癌患者 607 例,均经术后病理确诊,其中男性 376 例(61.94%),女性 231 例(38.06%);年龄 26~90 岁,平均年龄 63 岁;排除术前接受过放疗的患者。采用免疫组织化学 LDP 法检测切除的肿瘤组织标本中 MMR 蛋白 MLH1、MSH2、MSH6、PMS2 的表达和 P53、VEGF、Ki-67、CD34、D2-40 的表达情况,及与临床病理的关系。本研究获得四川省人民医院伦理委员会的批准[伦审(研)2018 年第 149 号]。

1.1.2 主要试剂 MLH1、MSH2、MSH6、PMS2、P53、VEGF、Ki-67、CD34、D2-40 购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

## 1.2 方法

1.2.1 实验方法 采用免疫组织化学 LDP 法。将患者手术切除的肿瘤标本,10%福尔马林固定,常规石蜡包埋,5 μm 连续切片。按产品说明书操作,第一抗体分别为 MLH1(鼠单抗,1:10)、MSH2(兔单抗,1:100)、MSH6(兔单抗,1:100)、PMS2(兔单抗,1:20)、P53(鼠单抗,1:100)、VEGF(兔多抗)、Ki-67(鼠单抗,1:100)、CD34(鼠单抗,1:100)、D2-40(鼠单抗,1:25),采用 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照,MLH1、MSH2 以正常结肠黏膜上皮表达情况作为阳性对照。MSH6、PMS2 以结肠癌表达情况作为阳性对照。P53 以乳腺癌表达情况作为阳性对照。VEGF 以肝癌表达情况作为阳性对照。Ki-67、D2-40 以扁桃体表达情况作为阳性对照。CD34 以血管内皮表达情况作为阳性对照。

1.2.2 结果判定 结合染色强度和阳性细胞百分比进行判断<sup>[4]</sup>,由两位病理科医生独立完成结果判定。

MLH1、MSH2、MSH6、PMS2、P53、Ki-67 蛋白均位于细胞核,VEGF 蛋白定位于细胞质/细胞膜,CD34 定位于血管内皮细胞的胞质。D2-40 蛋白定位于淋巴管细胞质,呈黄色或棕黄色染色为表达(+),不着色为缺失(-)。MLH1、MSH2、MSH6 和 PMS2 蛋白中任意一种不表达判定为 MMR 表达缺失,而 MLH1、MSH2、MSH6 和 PMS2 蛋白均表达则判定为 MMR 完整。

1.2.3 随访 每 3 个月随访 1 次,门诊随访和电话随访相结合,根据患者的检查结果、治疗方案,观察总体生存和无瘤生存情况。随访时间为 20~40 个月,截至 2018 年 4 月。

## 1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。计数资料的比较采用  $\chi^2$  检验。以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MMR 在结直肠癌中的表达

607 例标本中,共 216 例 MLH1、MSH2、MSH6、

PMS2 蛋白表达缺失,MMR 表达缺失率为 35.58%。其中男性 136 例,女性 80 例,年龄  $\leq 50$  岁 41 例。将 216 例 MMR 蛋白表达缺失患者设为阴性组,391 例表达正常患者设为阳性组,两组在肿瘤位置比较(左半结肠 vs. 右半结肠,直肠 vs. 右半结肠)差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ,表 1),MMR 蛋白阴性组右半结肠癌高发,阳性组左半结肠癌和直肠癌高发。两组年龄、性别比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 1 MMR 蛋白在结直肠癌中的表达

项目	MMR 蛋白表达( $n=607$ )		$P$
	阳性(%)	阴性(%)	
年龄(岁)			$>0.05$
$\leq 50$	75(12.36)	41(6.75)	
$> 50$	316(52.06)	175(28.83)	
性别			$>0.05$
男	240(39.54)	136(22.40)	
女	151(24.88)	80(13.18)	
部位			$<0.01$
右半结肠	60(9.88)	99(16.31)	
左半结肠	101(16.64)	35(5.77)	
直肠	230(37.89)	82(13.51)	

2.1.1 MMR 一项表达缺失结果 MMR 一项表达缺失,分别以 MLH1、PMS2 蛋白表达缺失为主。MLH1 蛋白表达缺失率为 3.95%,表达缺失组右半结肠 8 例,左半结肠+直肠 16 例;表达阳性组右半结肠 60 例,左半结肠+直肠 331 例。两组在肿瘤位置的比较(左半结肠/直肠 vs. 右半结肠),差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。PMS2 蛋白表达缺失率为 11.04%,表达缺失组右半结肠 17 例,左半结肠+直肠 50 例;表达阳性组右半结肠 60 例,左半结肠+直肠 331 例。两组在肿瘤位置的比较(左半结肠/直肠 vs. 右半结肠),差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。MLH1 蛋白、PMS2 蛋白阴性组右半结肠癌高发,阳性组左半结肠癌和直肠癌高发。

2.1.2 MMR 多项表达缺失结果 MMR 联合两项表达缺失,以 MLH1/PMS2 联合表达缺失为主。MLH1/PMS2 蛋白表达缺失率为 14.50%,表达缺失组右半结肠 49 例,左半结肠+直肠 39 例;表达阳性组右半结肠 60 例,左半结肠+直肠 331 例。右半结肠癌 MLH1/PMS2 蛋白表达缺失率明显高于左半结肠癌和直肠癌( $P < 0.01$ )。MMR 三项联合表达缺失 6 例,MLH1、MSH2、PMS2、MSH6 同时表达缺失 4 例。

### 2.2 MMR 蛋白表达与临床病理学关系

MMR 蛋白表达缺失的阴性组,高/中分化 146 例,低分化 70 例;表达正常的阳性组,高/中分化 313 例,低分化 78 例。两组在肿瘤分化程度(高/中分化 vs. 低分化)的比较,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ,表 2)。MMR 蛋

白表达缺失的阴性组, I/II 期 87 例, III 期 129 例; 表达正常的阳性组, I/II 期 190 例, III 期 201 例。两组 TNM 分期( I/II vs. III) 比较, 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ , 表 2)。MMR 蛋白表达缺失的阴性组, 有淋巴结转移 67 例, 无淋巴结转移 149 例; 表达正常的阳性组, 有淋巴结转移 199 例, 无淋巴结转移 192 例。两组淋巴结转移比较, 差异具有统计学意义( $P < 0.01$ , 表 2)。两组肿瘤大小比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。两组肿瘤病理类型的比较显示, 与黏液/印戒分化无关, 与淋巴细胞浸润无关, 差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 2 MMR 蛋白在结直肠癌中的表达与病理学关系

项目	MMR 蛋白表达		P
	阳性(n=391)	阴性(n=216)	
分化程度			<0.01
高/中分化	313	146	
低分化	78	70	
TNM 分期			<0.05
I/II 期	190	87	
III 期	201	129	
淋巴结转移			<0.01
有	199	67	
无	192	149	

### 2.3 P53、VEGF、Ki-67、CD34、D2-40 在结直肠癌中的表达

MMR 蛋白表达缺失的阴性组, VEGF 阳性 152 例, 阴性 64 例; 表达正常的阳性组, VEGF 阳性 334 例, 阴性 57 例, 两组比较差异具有统计学意义( $P < 0.01$ , 表 3)。MMR 蛋白表达缺失的阴性组, Ki-67 在 1% ~ 50% 有 97 例, 51% ~ 100% 有 119 例; 表达正常的阳性组, Ki-67 在 1% ~ 50% 有 132 例, 51% ~ 100% 有 259 例, 两组比较差异具有统计学意义( $P < 0.01$ , 表 3)。左半结肠癌和直肠癌的 VEGF、Ki-67 表达水平高于右半结肠癌。MMR 蛋白表达缺失的阴性组和表达正常的阳性组 P53、CD34、D2-40 的比较, 差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 3 VEGF、Ki-67 在结直肠癌中的表达

项目	MMR 蛋白表达		P
	阳性(n=391)	阴性(n=210)	
VEGF			<0.01
阳性	334	152	
阴性	57	64	
Ki-67(%)			<0.01
1 ~ 50	132	97	
51 ~ 100	259	119	

### 3 讨论

2017 年中国癌症数据报告显示结直肠癌的发病率

呈明显上升趋势, 分别位居男性肿瘤发病率的第 4 位, 女性的第 3 位, 城市年发病率高达 33.17/10 万人<sup>[1-2,5]</sup>。有研究发现, MMR 突变或甲基化导致的 MSI, 是结直肠癌发生的重要机制之一<sup>[3]</sup>。本研究在 MMR 蛋白表达缺失中分别以 MLH1、PMS2、MLH1/PMS2 蛋白表达缺失为主, 提示 MMR 蛋白表达阴性组右半结肠癌高发, 阳性组左半结肠癌和直肠癌高发。右半结肠癌和左半结肠癌在胚胎来源、分子特征、致癌机制等方面存在差异。右半结肠癌与 MMR 缺失、MSI 阳性表达、MLH1 基因甲基化、BRAF 基因突变等相关, 左半结肠癌与抑癌基因 APC、P53 等的失活、KRAS 基因突变相关<sup>[6]</sup>。

发病部位为 MLH1/PMS2 蛋白表达的独立影响因素。若 MLH1/PMS2 蛋白缺失, 可进一步安排 BRAF V600E 突变和 MLH1 启动子区甲基化的检测, 如结果为阴性应进行 MLH1/PMS2 基因种系突变检测, 根据结果确定是否为 Lynch 综合征<sup>[7-8]</sup>。本研究两组患者在肿瘤分化程度、TNM 分期、淋巴结转移方面比较, 差异均有统计学意义。术后定期随访发现, MMR 蛋白表达缺失的阴性组, 复发转移 8 例, 死亡 2 例; MMR 蛋白表达正常的阳性组, 复发转移 21 例, 死亡 7 例。有研究提示发病部位、TNM 分期是 MMR 蛋白表达的独立影响因素<sup>[9]</sup>。MMR 蛋白表达缺失的结直肠癌有其独特的生物学行为特征, 中国多项研究发现, 肿瘤多位于右半结肠, 肠外恶性肿瘤发病率较高, 低分化腺癌常见, 肿瘤预后好于散发性大肠癌<sup>[7,10]</sup>。家族史、低龄、右半结肠肿瘤、TNM 分期为 I ~ II 期、肿瘤侵入固有肌层为中国可疑 Lynch 综合征患者的高危临床病理学因素<sup>[11]</sup>。

本研究两组患者 VEGF、Ki-67 的比较, 差异具有统计学意义, 远端结肠和直肠癌的 VEGF 表达水平高于近端结肠癌。肿瘤原发部位基因表达和突变的差异, 影响化疗和分子靶向药物的效果, 导致左、右半结肠癌患者的预后不同<sup>[12]</sup>。抗血管生成抑制剂贝伐珠单抗靶向治疗的疗效和部位存在明显关系, 根据原发瘤部位选择结直肠癌靶向治疗, 对现有治疗方案选择产生深远影响<sup>[5]</sup>。Bendardaf 等<sup>[13]</sup>研究显示, 在 CAPEOX+贝伐珠单抗治疗的患者中, 与盲肠和升结肠癌比较, 乙状结肠和直肠癌的中位无进展生存时间和生存时间显著延长。有研究发现, P53 参与腺瘤-癌变途径, 可能仅对左半结肠癌有预后价值<sup>[14]</sup>。

Lynch 综合征占结直肠癌的 3% ~ 5%, 是 MMR 发生胚系突变所致的常染色体显性遗传性疾病, 具有患癌风险明显增加、加速的癌变进程、发病年轻化等特点, 需要与散发性结直肠癌鉴别<sup>[10]</sup>。对结直肠癌患者手术标本进行 MMR 的检测, 可以筛查 Lynch 综合征患者和家族成员, 避免漏诊。近期国内外指南和共识推荐结

直肠癌患者进行MMR免疫组织化学或MSI的检测,筛查Lynch综合征<sup>[3,7]</sup>。MMR的检测对外科决策较为重要,对于年轻的Lynch综合征相关结直肠癌患者,推荐扩大结肠切除范围<sup>[15]</sup>。在15%散发性结直肠癌中,MLH1启动子甲基化失活是其主要的发生机制,临床特征与Lynch综合征相似,肿瘤多位于右半结肠,病理分期以Dukes B期为主,病理形态以隆起型多见,MLH1表达缺失率高于MSH2等,需要与Lynch综合征鉴别<sup>[3,7]</sup>。

MMR在II/III期结直肠癌患者中可作为预后较好的生物学标志物<sup>[16]</sup>。某一MMR基因突变所导致的微卫星不稳定增高(MSI-H),预示对氟尿嘧啶化疗缺乏敏感性,不能从中受益<sup>[17]</sup>。结直肠癌的免疫治疗中,dMMR/MSI-H是预测抗PD-1单抗疗效的标志物。2017版NCCN指南中首次将免疫检查点抑制剂PD-1单抗 pembrolizumab 和 nivolumab 推荐用于具有dMMR/MSI-H分子表型的结直肠癌的末线治疗<sup>[18]</sup>。MMR基因突变检测为Lynch综合征诊断的“金标准”,但因费用较贵限制了其临床应用。患者的手术标本先进行MMR免疫组织化学法检测,根据结果再确定是否进行基因种系突变的检测<sup>[19]</sup>。一项回顾性研究显示,免疫组织化学联合检测MLH1、MSH2、MSH6、PMS2蛋白缺失的敏感度为77%~100%,特异性为98%~100%,与MSI检测相当<sup>[20]</sup>。另一项系统回顾研究表明,在结直肠癌患者中筛查Lynch综合征,MSI检测的敏感度为66.7%~100.0%,特异性为61.1%~92.5%。免疫组织化学法检测的敏感度为80.8%~100.0%,特异性为80.5%~91.9%。两种检测方法均可较好地用于Lynch综合征的筛查<sup>[19]</sup>。因此,免疫组织化学法检测可作为MMR缺失分析的首选筛选方法,达到初步筛选Lynch综合征患者的目的<sup>[20]</sup>。

综上所述,MMR蛋白检测的应用,为结直肠癌患者及时筛查发现、治疗及随访Lynch综合征相关恶性肿瘤提供了简便有效的方法,由此可降低患癌的风险,不断提高人类健康水平。

#### 参考文献

- [1] 中国结直肠癌筛查、早诊早治和综合预防共识意见[J]. 胃肠病学, 2011,16(11):666-675.
- [2] 陈万青,李贺,孙可欣,等. 2014年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中华肿瘤杂志,2018,40(1):5-13.
- [3] Joel HR, Robert E, Joel H, et al. American gastroenterological association institute guideline on the diagnosis and management of Lynch syndrome[J]. *Gastroenterology*, 2015, 149(3):777-782.
- [4] 许良中,杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准[J]. 中国癌症杂志,1996,6(4):229-231.
- [5] 杜楠. 结直肠癌治疗进展[J]. 中国癌症防治杂志,2017,9(5):350-355.
- [6] Kim JH, Kang GH. Molecular and prognostic heterogeneity of microsatellite-unstable colorectal cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(15):4230-4243.
- [7] Stoffel EM, Mangu PB, Gruber SB, et al. Hereditary colorectal cancer syndromes: American society of clinical oncology clinical practice guideline endorsement of the familial risk-colorectal cancer: European society for medical oncology clinical practice guidelines[J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(2):209-217.
- [8] Boland PM, Yurgelun MB, Boland CR. Recent progress in Lynch syndrome and other familial colorectal cancer syndromes[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, (27):1-15.
- [9] Hernâni-Eusébio J, Barbosa E. Phenotypic heterogeneity by germline mismatch repair gene defect in Lynch syndrome patients[J]. *Acta Med Port*, 2016, 29(10):587-596.
- [10] 李晓芬,袁瑛. 中国Lynch综合征的过去、现在和将来[J]. 中华结直肠疾病电子杂志,2015,4(3):21-26.
- [11] Jun YL, Jian QS. Advances in the study of Lynch syndrome in China[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(22):6861-6871.
- [12] 徐建明. 从左右半结肠癌的生物学差异谈结直肠癌[J]. 中华肿瘤杂志,2016,38(5):397-400.
- [13] Bendardaf R, Buhmeida A, Hilska M, et al. VEGF-1 expression in colorectal cancer is associated with disease localization,stage,and long-term disease-specific survival[J]. *Anticancer Res*, 2008, 28(6B):3865-3870.
- [14] Murcia O, Juárez M, Hernández-Illán E, et al. Serrated colorectal cancer: molecular classification,prognosis,and response to chemotherapy[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(13):3516-3530.
- [15] Leicher LW, Lammertink MHA, Offerman SR, et al. Consequences of testing for mismatch repair deficiency of colorectal cancer in clinical practice[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2018, 53(5):632-636.
- [16] Yan WY, Hu J, Xie L, et al. Prediction of biological behavior and prognosis of colorectal cancer patients by tumor MSI/MMR in the Chinese population[J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 8(9):7415-7424.
- [17] Klingbiel D, Saridaki Z, Roth AD, et al. Prognosis of stage II and III colon cancer treated with adjuvant 5-fluorouracil or FOLFIRI in relation to microsatellite status:results of the PETACC-3 trial[J]. *Ann Oncol*, 2015, 26(1):126-132.
- [18] Diaz LA, Le DT. PD-1 Blockade in tumors with mismatch-repair deficiency [J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(20):1979-2002.
- [19] Snowsill T, Coelho H, Huxley N, et al. Molecular testing for Lynch syndrome in people with colorectal cancer: systematic reviews and economic evaluation[J]. *Health Technol Assess*, 2017, 21(51):1-238.
- [20] Pino MS, Chung DC. Microsatellite instability in the management of colorectal cancer[J]. *Exp Rev Gastroenterol Hepatol*, 2011, 5(3):385-399.

(2018-05-13 收稿)

(2018-09-05 修回)

(编辑:武斌 校对:邢颖)

#### 作者简介

邱春华 专业方向为结直肠肿瘤分子遗传学相关研究。

E-mail: zyqch730@163.com

