

网络出版时间: 2019-1-3 17:26 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20181230.1809.028.html>

◇ 经验与体会 ◇

散发性结直肠癌微卫星不稳定状态 与临床病理特征及预后的关系

蒋 娜, 隋燕霞, 蒋依娜, 张冠军

摘要 选取 213 例散发性结直肠癌(CRC)患者的手术切除标本,采用免疫组化(IHC)方法检测肿瘤组织中错配修复蛋白(MMR)表达及 PCR-毛细管电泳法检测微卫星状态。213 例患者中微卫星不稳定(MSI)为 35 例,占 16%, MSI 与肿瘤组织学分级、分型、部位、淋巴结转移、分期有关,随机抽取 20 例标本进行 PCR-毛细管电泳法检测,其中 3 例肿瘤组织显示高频微卫星不稳定(MSI-H)。MSI 肿瘤具有明显的临床病理特征,预后优于微卫星稳定(MSS)患者。

关键词 结直肠癌; 微卫星不稳定; 免疫组化; 总生存期

中图分类号 R 365

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)01-0139-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.01.028

结直肠癌(colorectal cancer, CRC) 是全世界第

三高发恶性肿瘤,2015 年 CRC 约占到全世界癌症总数的 9.7%^[1]。CRC 的发生是一系列复杂的基因疾病的结果。微卫星不稳定(microsatellite instability, MSI)的肿瘤被定义为免疫组化(immunohistochemistry, IHC)染色检测有一个或多个错配修复蛋白(mismatch repair protein, MMR)缺失或基因检测表现出高频微卫星不稳定(high frequency microsatellite instability, MSI-H)。MSI 占散发性 CRC 的 15%, 其具有独特的发生机制、预后、治疗方案以及与林奇综合征(Lynch syndrome, Lynch)有密切的关系。IHC 法检测 MMR 缺失的被认可和使用,使得检测 MSI 变得简便易行,有利于为肿瘤治疗提供策略。秦云等^[2]证明此法的敏感度为 94.9%, 特异度为 100.0%。目前关于 MSI 的研究不仅仅局限于发病机制上,其与 CRC 预后的关系也成为目前研究的热点。该研究通过分析 CRC 的临床病理特点与 MSI 的关系和随访 CRC 患者的生存状态,探讨 MSI 对中国人散发性 CRC 生存的影响。

2018-07-26 接收

基金项目: 陕西省社会发展科技攻关项目(编号: 2016SF-174)

作者单位: 西安交通大学第一附属医院病理科, 西安 710061

作者简介: 蒋 娜, 女, 主治医师;

隋燕霞, 女, 副主任医师, 责任作者, E-mail: [yanxiasuiblk@](mailto:yanxiasuiblk@163.com)

163.com

Research the diagnosis of wide band acoustic absorbance in children otitis media with effusion

Li Li, Tong Busheng

(Dept of Otolaryngology Head and Neck Surgery, The First Affiliated Hospital
of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To research the diagnostic value of the wide band acoustic absorbance rate in children otitis media with effusion. **Methods** The wide band acoustic absorbance rate was tested in 114 children (a control group of 30 healthy children; 50 patients shown middle ear effusion during tympanotomy; and 34 patients with chronic effusion shown no middle ear effusion during tympanotomy). The data of each group were analyzed, and the diagnostic value of wide band absorbance was analyzed with the receiver operating characteristic curve. **Results** The wide band acoustic absorbance rate of otitis media with effusion group was notably lower than that of non-effusion group and control group at the 0.5 ~ 4 kHz averaged absorbance ($P < 0.05$). After analyzing the receiver operating characteristic curve, it showed that the diagnosis value was highest in the range of 0.5 ~ 2 kHz (area under the curve 0.984), followed by 1 kHz and 1.5 kHz (area under the curve: 0.973 and 0.967). **Conclusion** Compared with the conventional 226 Hz tympanometry, the wide band tympanometry is more accurate for the diagnosis of children otitis media with effusion. It can be used as a better method for the diagnosis of otitis media exudative lesions.

Key words wide band tympanometry; middle ear effusion; asorbance

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集西安交通大学第一附属医院 2014 年 1 月~2016 年 12 月经手术切除的 CRC 患者标本中 213 例的肿瘤组织与远离肿瘤组织正常直肠黏膜组织,有家族性腺瘤性息肉病的患者被排除。另外,入选病例术前均未行放、化疗。在分析的 213 例患者中,男 118 例,女 95 例;年龄 19~92 岁,中位年龄 59 岁,生存时间定义为自手术治疗之日至末次随访日或死亡所经历的时间,以月为单位计算。至研究终点(2017 年 12 月)。依据 2010 版 WHO 组织学分级系统,将 CRC 分为高、中、低分化,如超过 50% 的肿瘤细胞表现为粘液分化,则被归为粘液腺癌。

1.2 研究方法 标本经 10% 中性福尔马林固定,常规脱水、包埋,4 μm 切片,HE 染色,光镜观察,并应用免疫组化 Envision 法染色。所用免疫组化一抗错配修复蛋白 MSH2(mutS homolog 2)、错配修复蛋白 MSH6(mutS homolog 6)、错配修复蛋白 MLH1(mutL homolog 1)、错配修复蛋白 PMS2(PMS1 homolog 2) 及二抗 鼠兔通用型抗体,二氨基联苯胺(DAB)显色,购自福州迈新公司。采用 Ventana BenchMark XT system 进行免疫组化染色。按照全部肿瘤细胞核均无着色方判定为该蛋白表达丢失。周围间质细胞和浸润淋巴细胞作为内对照。有 MMR 蛋白表达缺失的病例判定为 MSI,未出现 MMR 蛋白表达缺失的判定为微卫星稳定(microsatellite stability, MSS)。MSI 检测采用 PCR-毛细管电泳法检测,选择肿瘤及远离肿瘤的正常切缘组织,采用德国 Qiagen 公司的 DNA 提取试剂盒(QIAamp DNA FFPE Kit)提取石蜡组织中的 DNA,采用美国 Promega 公司的 MSI 检测试剂盒特异性扩增 Bat25、Bat26、NR-21、NR-24、MONO-27 位点,使用美国 ABI 公司 Applied Biosystems 3500 对扩增产物进行检测,使用 GeneMapper4.1 软件进行数据分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析,计数资料比较采用 χ^2 检验和 Fisher 确切概率法,生存分析采用 Kaplan-Meier 法并绘制生存曲线、Log-rank 法比较组间生存时间的差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CRC 组织中 MMR 蛋白 MLH1、MSH2、MSH6、PMS2 免疫组化表达缺失率 35 例发生 MMR 蛋白表达缺失,见图 1,其中 12 例为 MLH1 蛋

白和 PMS2 蛋白表达缺失;6 例为 MSH2 蛋白和 MSH6 蛋白表达缺失;4 例为 MSH2 蛋白表达缺失;12 例为 MLH1 蛋白表达缺失;1 例为 MSH6 蛋白表达缺失。本研究显示 MMR 蛋白表达缺失病例多为肿瘤组织学分级为低分化,病理分型为粘液腺癌,右半结肠肿瘤,并与淋巴结转移情况及分期相关,MSI 患者中只有 4 例发生淋巴结转移,大多数为 II 期患者。而与患者年龄、性别、脉管浸润、神经浸润无显著相关性。见表 1。

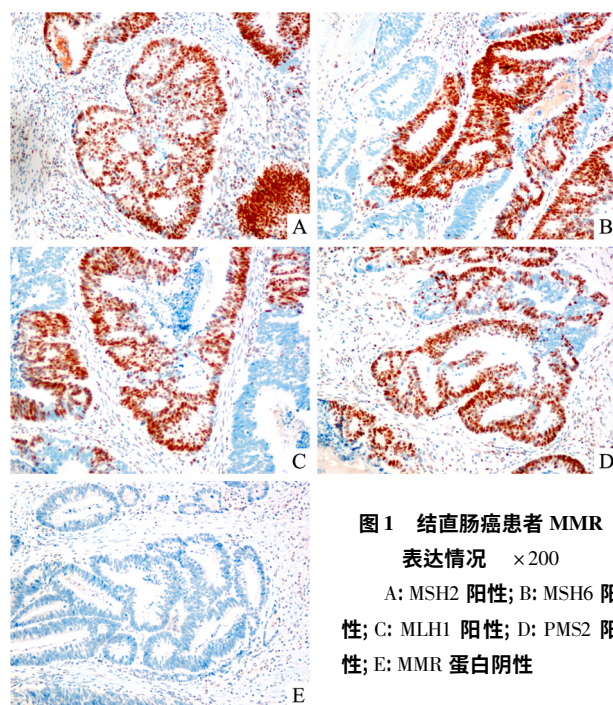


图 1 结直肠癌患者 MMR 表达情况 $\times 200$

A: MSH2 阳性; B: MSH6 阳性; C: MLH1 阳性; D: PMS2 阳性; E: MMR 蛋白阴性

2.2 MSI 检测结果 随机抽取 20 例标本进行 PCR-毛细管电泳法检测,其中 3 例肿瘤组织显示高频微卫星不稳定(high frequency microsatellite instability, MSI-H),其中 1 例肿瘤组织显示低频微卫星不稳定(low frequency microsatellite instability, MSI-L),其余肿瘤组织显示 MSS,见图 2。

2.3 生存分析 随访时间截止到 2017 年 12 月结束,41 例(19%)的 CRC 患者死亡,均死于肿瘤复发转移,随访时间 12~48 个月,中位随访时间 25 个月。12 例(6%)患者失访。同样,MSI 患者总体生存时间(overall survival time, OS)高于 MSS 患者,预后较好(OS: $\chi^2 = 4.004, P < 0.05$),见图 3。

3 讨论

CRC 在男女均是高发肿瘤,平均发病年龄 62 岁^[3]。Thibodeau et al^[4]对导致 Lynch 综合症的错配

表1 MSI和MSS结直肠癌患者临床病理特征的比较

临床病理指标	MSS(n = 178)	MSI(n = 35)	P 值	χ^2 值
性别				
男	97	21	0.549	0.359
女	81	14		
年龄(岁)				
>60	113	17	0.561	0.338
≤60	100	18		
肿瘤部位				
右半结肠	42	17	0.002	12.558
左半结肠	35	19		
直肠	101	9		
病理类型				
腺癌	162	27	0.018	5.627
粘液腺癌	16	8		
分化程度				
高	12	0	0.034	6.791
中	142	25		
低	24	0		
神经浸润				
有	6	1	0.876	0.024
无	172	34		
脉管浸润				
有	9	2	0.872	0.026
无	169	33		
TNM 分期				
I	10	2	0.025	10.985
II	92	27		
III	58	3		
IV	18	3		
淋巴结转移				
无	117	31	0.018	7.993
≤3个	41	4		
>3个	20	0		

修复基因进行微卫星研究,由此认识到一种定义为 MSI 的现象。MSI 通路是由于 DNA 错配修复基因失活而发生,约15%的散发性 CRC 是由由此发生。其病因通常是人类 MLH1 错配修复基因(human MutL homolog 1, hMLH1) 启动子甲基化,MMR 基因沉默导致 IHC 显示相关 MMR 蛋白阴性,表现 MSI。然而,在散发性 CRC,MSI 的特征和重要性还知之甚少,并且 MSI 能否预测 CRC 患者预后仍有争论。

本研究显示,大约16%的肿瘤表现为 MSI,这一结果与之前的研究^[9]结果基本一致。而且采用 PCR-毛细管电泳法检测与 IHC 染色检测 MMR 蛋白获得的 MSI-H 比例一致。本研究结果还表明,MSI 结直肠癌具有明显的临床病理特点,如多位于右半结肠,组织学多为粘液腺癌,组织学分级多为低分化,疾病分期早,淋巴结转移少见。有文献^[8]报道 MSI 肿瘤多为女性,本研究没有证实性别与其有关,因此对于 MSI-H 与性别是否有关尚存在争议,有待

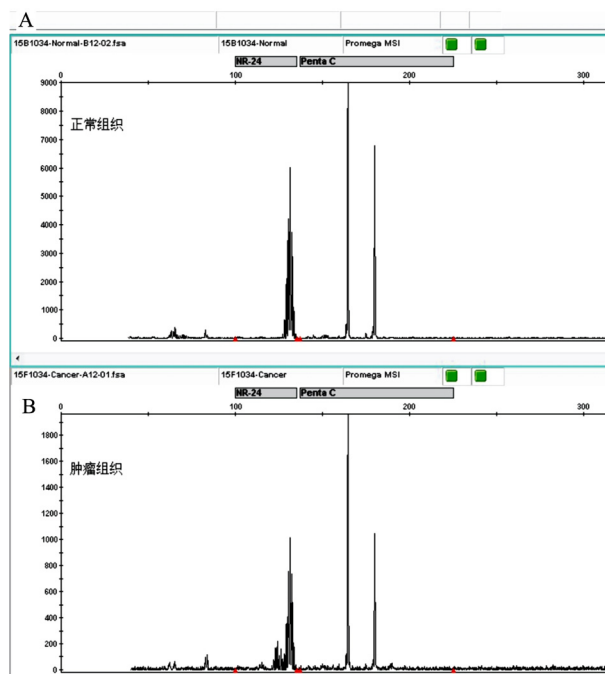


图2 PCR-毛细管电泳法检测

A: 正常组织; B: 同源癌组织, 检测结果为 MSI-H 结直肠癌

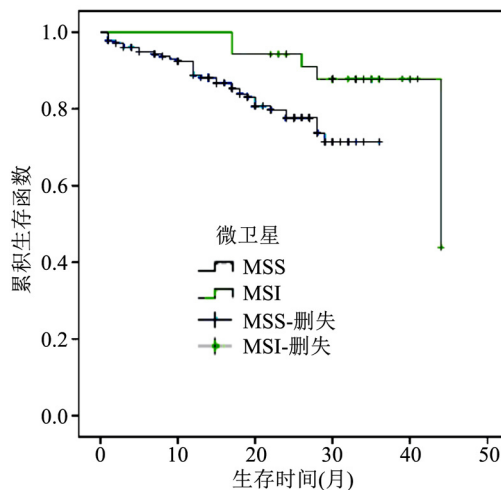


图3 结直肠癌患者的 OS 生存曲线

进一步研究。另外,值得注意的是有文献^[9]报道 MSI 肿瘤患者年龄分布具有特点,伴有 MLH1 超甲基化的患者与伴有 MMR 基因胚系突变的患者相比年龄较大,而后者则较年轻。在一些学者的研究^[8]中表明 MMR 缺失的病例较少发生淋巴结转移,这与本研究结果一致。还有些学者研究^[9]表明 MSI 与肿瘤分期无关,但本研究显示 MSI-H 病例多为 II 期患者,这可能和散发性 MSI-H 结直肠癌异质性更高,研究所选区域不能完全反映肿瘤整体,以及病例数量有关。

本研究显示不论任何一种组织学亚型的 CRC,

只要伴有 MSI, 生存期均有所提高。有学者研究^[1]显示伴有 MSI 的 II 期 CRC 患者 6 年生存率为 97%, 因此, 这些患者手术后不需要辅助化疗。这些都提示 MMR 蛋白表达状态与 CRC 预后密切相关, 并且可以很好地解释本研究结果中伴有 MSI 的肿瘤淋巴结转移的减少。虽然 MSI 检测是金标准, 但 IHC 检查 MMR 蛋白性价比较高, 更易于患者接受, 因此所有 CRC 患者特别是 <60 岁患者都应进行筛查。IHC 检查 MMR 蛋白为患者病情转归和化疗疗效提供预测, 影响患者治疗策略的选择, 并提示 Lynch 综合征, 促进肿瘤的个体化治疗。

伴有 MSI 的 CRC 之所以有良好的预后是因为肿瘤本身的组织学特点。肿瘤组织周围以淋巴细胞为主的增强的炎症反应可能有助于生存时间的延长。目前本研究缺乏炎症反应方面的资料, 但关于这一组织学特点的研究未来可能会成为研究的热点。

有研究^[1]显示 MMR 蛋白缺失的 III 期和 IV 期 CRC 患者发生肿瘤转移的比例较低, 并且 OS 显著提高。散发性伴有 MSI 的 CRC 患者与染色体不稳定(chromosomal instability, CIN) 途径发生 CRC 的患者相比预后较好。这一结果可能是由于 p53 和 K-ras 基因突变在伴有 MSI 的 CRC 较为少见。本研究的病例中, MSI 患者以 II 期肠癌为主, 同时具有更长的总体生存时间, III 期和 IV 期患者相对较少, 其中伴有 MSI 的病例则更少, 因此微卫星状态对 III 期和 IV 期 CRC 患者预后的影响了解较少。

参考文献

[1] Mahasneh A, Al-Shaheri F, Jamal E, et al. Molecular biomarkers

for an early diagnosis, effective treatment and prognosis of colorectal cancer: current updates [J]. *Exp Mol Pathol*, 2017, 102(3): 475–83.

[2] 秦云, 梁莉萍, 郑兴征等. 免疫组织化学法检测结肠癌四种 DNA 错配修复蛋白表达缺失对判断肿瘤微卫星状态的价值. *中华病理学*, 2015, 44(10): 704–8.

[3] Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics [J]. *CA Cancer Clin*, 2014, 64(2): 104–17.

[4] Thibodeau S N, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon [J]. *Science*, 1993, 260(5109): 816–9.

[5] Zoratto F, Rossi L, Verrico M, et al. Focus on genetic and epigenetic events of colorectal cancer pathogenesis: implications for molecular diagnosis [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(7): 6195–206.

[6] Raut C P, Pawlik T M, Rodriguez – Bigas M A. Clinicopathologic features in colorectal cancer patients with microsatellite instability [J]. *Mutat Res*, 2004, 568(2): 275–82.

[7] Boland C R. Clinical uses of microsatellite instability testing in colorectal cancer: an ongoing challenge [J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(7): 754–6.

[8] Ghanipour L, Jirstrom K, Sundstrom M, et al. Associations of defect mismatch repair genes with prognosis and heredity in sporadic colorectal cancer [J]. *Eur J Surg Oncol*, 2017, 43(2): 311–21.

[9] Karahan B, Argon A, Yidirim M, et al. Relationship between MLH-1, MSH-2, PMS-2, MSH-6 expression and clinicopathological features in colorectal cancer [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(4): 4044–53.

[10] Andre' T, de Gramont A de, Vernerey D, et al. Adjuvant fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin in stage II to III colon cancer: updated 10-year survival and outcomes according to BRAF mutation and mismatch repair status of the MOSAIC study [J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(35): 4176–87.

[11] Popat S, Hubner R, Houlston R S, et al. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis [J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(3): 609–18.

Relationship between microsatellite instability and clinicopathological features and prognosis in sporadic colorectal cancer

Jiang Na, Sui Yanxia, Jiang Yina, et al

(Dept of Pathology, The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061)

Abstract 213 cases of sporadic colorectal cancer were selected. The expression of mismatch repair protein (MMR) was detected by immunohistochemistry, and the microsatellite status was detected by PCR-capillary electrophoresis. Microsatellite instability (MSI) was found in 35 out of 213 cases, accounting for 16%. MSI was related to histological grade, classification, location, lymph node metastasis and staging of tumor. 20 cases were randomly selected for PCR-capillary electrophoresis, and 3 cases showed high frequency microsatellite instability (MSI-H). MSI tumors have obvious clinicopathologic features and have better prognosis than MSS patients.

Key words colorectal cancer; microsatellite instability; immunohistochemistry; overall survival