

网络出版时间: 2018-8-2 09:40 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180731.1310.022.html>

老年散发性结直肠癌中 hMLH1、hMSH2、hMSH6 的表达及与预后的相关性

张良良¹, 宋 倩², 石红建², 任景丽³, 卞晓星⁴

摘要 目的 探讨老年 II - III 期散发性结直肠癌(SCC)中错配修复蛋白(MMR)的表达及与预后的相关性。方法 收集 SCC 术后石蜡标本 232 例,采用免疫组织化学法检测其中 hMLH1、hMSH2、hMSH6 的表达情况,分析老年 SCC 患者 MMR 表达与其临床病理特征及预后之间的关系。结果 老年组、非老年组 MMR 蛋白表达缺失率分别为 17.71%(26/152)、26.25%(21/80),差异无统计学意义($P=0.100$)。对于老年散发性结直肠癌患者,MMR 阴性表达在分期、分化程度、肿瘤大小、淋巴结转移间的差异均有统计学意义($P<0.05$)。对于非老年 SCC 患者,MMR 阴性表达在分期、分化程度、淋巴结转移方面差异有统计学意义($P<0.05$)。对于老年 SCC 患者,MMR 缺失组、正常组的 5 年生存率分别为 84.62%(22/26)、56.35%(71/126),差异有统计学意义($\chi^2=9.001, P=0.003$)。对于非老年 SCC 患者,MMR 缺失组、正常组的 5 年生存率分别为 80.95%(17/21)、49.15%(29/59),差异有统计学意义($\chi^2=6.991, P=0.008$)。单因素和多因素分析显示,MMR 状态是影响老年 SCC 患者生存时间

的独立因素($P<0.05$)。结论 老年 SCC 患者 MMR 表达缺失多见于 II 期、高分化、肿瘤直径 ≥ 5 cm 的患者,更难发生淋巴结转移;MMR 状态为影响老年 SCC 患者预后的独立因素。MMR 表达缺失组较 MMR 正常组预后好。

关键词 错配修复蛋白;结直肠癌;老年;病理特征;预后
中图分类号 R 574.6

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)09-1426-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.09.022

近年来结直肠癌的发病率与死亡率上升至第 3 位和第 4 位^[1]。结直肠癌总数的 95%^[2]左右为散发性结直肠癌(sporadic colorectal carcinoma, SCC)。SCC 中 15% 是由错配修复(mismatch repair, MMR)蛋白表达缺失而引起的^[3]。MMR 基因的功能在于维持基因复制的准确性,翻译正常的错配修复蛋白,发挥抗肿瘤作用,如其发生突变或甲基化,致癌基因将得到聚集,导致肿瘤发生^[4]。随着人口老龄化,老年 SCC 患者不断增多,且 SCC 患者中现仍以老年人为主^[5],但 MMR 在老年 SCC 中的研究则较少,老年 SCC 患者中 MMR 的具体作用需要进一步的分析研究。基于此,该研究将探讨老年 SCC 患者中 MMR 蛋白 hMLH1、hMSH2 和 hMSH6 的表达及与预后的相关性,旨在为老年 SCC 患者的诊疗及对预后的估计提供参考依据。

2018-05-24 接收

基金项目: 河南省科技攻关计划(编号: 201503099)

作者单位: 江苏大学附属武进医院¹ 普外科、² 介入血管科、⁴ 神经外科,常州 213002

³ 郑州大学第二附属医院病理科,郑州 450014

作者简介: 张良良,男,硕士研究生;

卞晓星,男,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: wybx2@163.com

the relationship with cognitive performance in patients with Alzheimer's disease (AD). **Methods** We collected resting-state and structural magnetic resonance image data of 16 patients with AD and 17 normal controls (NC). The cognitive performance was also evaluated with mini-mental state examination (MMSE). The voxel-based morphometry was applied within the mask of left hippocampus and the functional connectivity was calculated based the seed of left hippocampal subregions, including hippocampus-emotional subregion (HIPe), hippocampus-cognitive subregion (HIPc) and hippocampus-perceptive subregion (HIPp). **Results** Gray matter volume of left hippocampal subregions (HIPc, HIPe, HIPp) was significantly lower in AD than NC. Compared with NC, AD showed increased functional connectivity between left HIPc and right dorsolateral prefrontal cortex (DLPFC) (voxel $P<0.001$, cluster $P<0.05$). There was no significant difference of functional connectivity based on the seed of HIPe or HIPp. **Conclusion** In patients with AD, the volume of gray matter decreased in the left hippocampal subregions, and the left HIPc was dysfunctional.

Key words Alzheimer's disease; hippocampal subregions; voxel-based morphometry; functional connectivity

1 材料与方法

1.1 病例资料 筛选从2009年6月~2012年6月江苏大学附属武进医院病理科 SCC 术后的标本,共232例,分为老年组152例(年龄 ≥ 65 岁),非老年组80例(年龄 < 65 岁)。老年组患者年龄65~86(73.71 ± 7.63)岁,非老年组患者年龄30~59(46.8 ± 8.56)岁。入组标准:①所有患者具有完整的临床信息;②术前均未进行放、化疗;③均经术前及术后病理检查,明确诊断为 SCC;④分期均为 II~III 期,分期符合美国癌症联合委员会(AJCC)第七版分期标准^[3]。其中 II 期结肠癌患者包括以下至少一项高危因素:组织学分化差(III或IV级)、标本检出淋巴结不足(少于12枚)、T4、脉管浸润、术前肠梗阻或肠穿孔;⑤化疗方案均应用 FOLFOX 方案。

1.2 方法 在 MMR 系统中,MMR 基因主要依赖 hMLH1、hMSH2 和 hMSH6 蛋白发挥作用^[4],因此采用免疫组织化学方法测定上述蛋白的表达情况。步骤:将标本用 40 g/L 的甲醛固定,石蜡包埋,按 5 μ m 的厚度连续切片,用 PV-9000 二步法,常规 HE 染色,于组织细胞状态较好处,用免疫组织化学法染色,一抗为 hMLH1、hMSH2、hMSH6 鼠抗人单克隆抗体(北京中杉金桥生物有限公司),阴性对照以磷酸盐缓冲液代替一抗做阴性对照。以正常结直肠黏膜上皮或浸润的淋巴细胞为阳性对照。

1.3 结果判定 结果判断标准:①按将阳性细胞所

占的比例进行评分:无阳性细胞为 0 分,阳性细胞 $\leq 10\%$ 为 1 分,11%~50%为 2 分,51%~75%为 3 分, $> 76\%$ 为 4 分;②将染色程度进行评分:棕褐色为 3 分,棕黄色为 2 分,淡黄色为 1 分,无色为 0 分;染色程度评分和阳性细胞的比例评分的乘积 ≥ 2 分,判定为 MMR 蛋白表达正常, < 2 分判定为表达缺失。以正常的结直肠黏膜上皮核染色作阳性对照。hMLH1、hMSH2、hMSH6 均表达正常判定为表达正常(proficient mismatch repair, pMMR),否则判定为表达缺失(deficient mismatch repair, dMMR)。

1.4 随访 每 3~6 个月对患者进行一次随访;随访内容包括:治疗方案、是否复发、复发时间、生存时间等。随访截至日期为 2017 年 6 月,随访时间为 11~60 个月。

1.5 统计学处理 应用 SPSS 21.0 软件对资料进行分析。计数资料比较采用 χ^2 检验。采用 Kaplan-Meier 法对生存时间曲线进行绘制,并以 Log-rank 检验进行比较。单因素及多因素分析采用 Cox 比例风险模型, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MMR 蛋白的表达情况 老年组共有 26 例 MMR 蛋白表达缺失,缺失率为 17.71%(26/152);非老年组共有 21 例 MMR 蛋白表达缺失,缺失率为 26.25%(21/80),两组相比,差异无统计学意义($P = 0.100$)。见图 1。

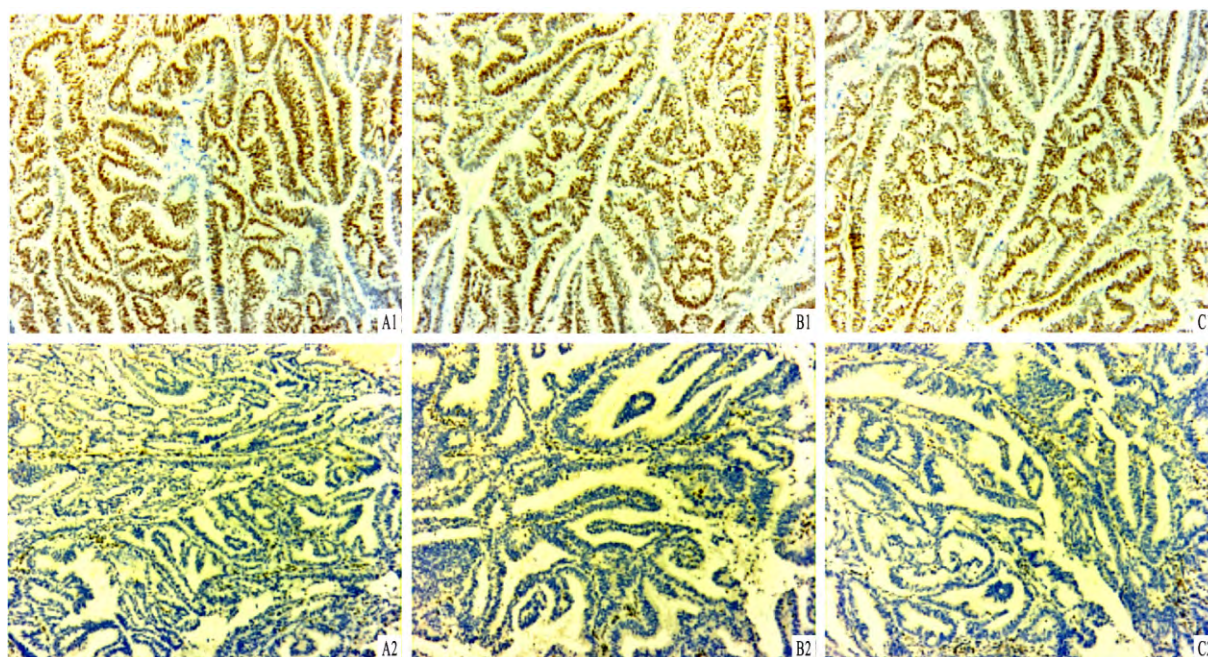


图1 MMR 蛋白免疫组织化学图 $\times 100$

A: hMLH1 蛋白; B: hMSH2 蛋白; C: hMSH6 蛋白; 1: 表达正常; 2: 表达缺失

2.2 MMR 蛋白表达与 SCC 患者临床病理特征的关系 老年组: dMMR 组患者和 pMMR 组患者在分期、分化程度、肿瘤大小、淋巴结转移方面差异有统计学意义($P < 0.05$); 与 pMMR 组相比, dMMR 组患者更多见于高分化、II 期、肿瘤直径 ≥ 5 cm 的患者, 更难发生淋巴结转移。非老年组: dMMR 组患者和 pMMR 组患者在分期、分化程度、淋巴结转移方面差异有统计学意义($P < 0.05$); 与 pMMR 组相比, dMMR 组患者更多见于高分化、II 期的患者, 更难发生

淋巴结转移。见表 1。

2.3 MMR 表达与 SCC 患者预后的关系 老年组: dMMR 组的 5 年生存率为 84.62% (22/26), 高于 pMMR 组 56.35% (71/126), 差异有统计学意义($\chi^2 = 9.001, P = 0.003$)。非老年组: dMMR 组的 5 年生存率为 80.95% (17/21), 高于 pMMR 组 49.15% (29/59), 差异有统计学意义($\chi^2 = 6.991, P = 0.008$)。见图 2。

2.4 单因素和多因素分析 单因素分析结果显示:

表 1 MMR 表达缺失组和 MMR 表达正常组患者临床病理特征比较(n)

项目	老年组				非老年组			
	dMMR 组	pMMR 组	χ^2 值	P 值	dMMR 组	pMMR 组	χ^2 值	P 值
性别			0.857	0.354			1.138	0.286
男	16	65			10	36		
女	10	61			11	23		
部位			0.062	0.804			0.042	0.838
右半结肠	15	76			13	38		
直肠 + 左半结肠	11	50			8	21		
大小(cm)			8.814	0.003			0.15	0.698
≥ 5	17	43			10	31		
< 5	9	83			11	28		
组织学类型			0.242	0.623			0.095	0.758
腺癌	20	91			15	40		
粘液腺癌及其他	6	35			6	19		
分期								
II	19	53	8.315	0.004	12	19	4.059	0.044
III	7	73			9	40		
大体类型			0.042	0.979			0.084	0.959
溃疡	15	70			11	30		
隆起	6	31			6	16		
浸润	5	25			4	13		
分化程度			6.284	0.012			4.601	0.032
高	15	40			16	29		
中低	11	86			5	30		
淋巴结转移			8.315	0.004			4.059	0.044
有	7	73			9	40		
无	19	53			12	19		

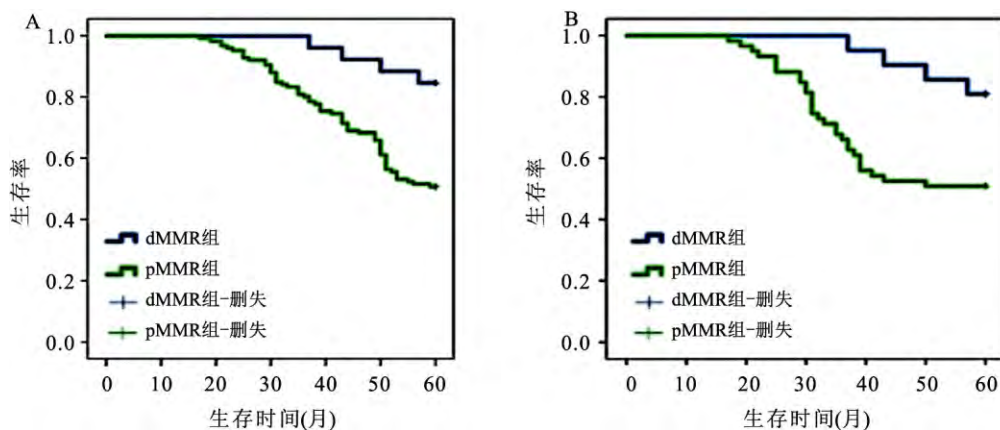


图 2 SCC 患者 dMMR 组与 pMMR 组生存时间比较

A: 老年组; B: 非老年组

表2 影响患者生存时间的单因素 COX 回归分析结果

变量	生存时间				
	β	SE	Wald χ^2 值	P 值	RR(95% CI)
老年组					
分期	0.058	0.247	0.055	0.813	0.944(0.582 ~ 1.531)
性别	0.454	0.246	3.391	0.058	1.574(0.971 ~ 2.551)
分化程度	0.759	0.288	6.967	0.006	2.137(1.216 ~ 3.756)
部位	0.263	0.249	1.112	0.292	0.769(0.472 ~ 1.253)
大小	0.086	0.248	0.12	0.726	0.918(0.564 ~ 1.492)
组织学类型	0.658	0.163	16.277	0.001	1.930(1.402 ~ 2.657)
淋巴结转移	0.058	0.247	0.055	0.813	0.944(0.582 ~ 1.531)
大体类型	0.34	0.154	4.839	0.031	0.401(0.396 ~ 1.335)
MMR 状态	1.412	0.516	7.482	0.003	0.244(0.089 ~ 0.670)
非老年组					
分期	0.124	0.349	0.127	0.719	0.883(0.446 ~ 1.749)
性别	0.472	0.346	1.865	0.164	1.604(0.814 ~ 3.160)
分化程度	0.769	0.378	4.141	0.035	2.157(1.029 ~ 4.523)
部位	0.395	0.344	1.32	0.243	0.674(0.343 ~ 1.322)
大小	0.4	0.389	1.06	0.295	0.670(0.313 ~ 1.436)
组织学类型	1.191	0.406	8.58	0.002	3.289(1.483 ~ 7.294)
淋巴结转移	0.124	0.349	0.127	0.719	0.883(0.446 ~ 1.749)
大体类型	0.14	0.222	0.399	0.815	1.151(0.744 ~ 1.779)
MMR 状态	1.303	0.533	5.973	0.008	3.682(1.294 ~ 10.470)

RR: 相对危险度

表3 老年组生存时间的多因素 COX 回归分析结果

变量	生存时间				
	β	SE	Wald χ^2 值	P 值	RR(95% CI)
分期	0.171	0.254	0.454	0.253	1.186(0.722 ~ 1.951)
分化程度	0.727	0.294	6.101	0.014	0.483(0.271 ~ 0.861)
部位	0.224	0.251	0.796	0.372	1.251(0.765 ~ 2.047)
大小	0.27	0.252	1.154	0.283	1.310(0.800 ~ 2.146)
组织学类型	1.531	0.313	6.334	0.097	0.591(0.643 ~ 0.731)
MMR 状态	1.423	0.526	7.431	0.006	0.239(0.085 ~ 0.668)

RR: 相对危险度

表4 非老年组生存时间的多因素 COX 回归分析结果

变量	生存时间				
	β	SE	Wald χ^2 值	P 值	RR(95% CI)
分期	0.156	0.156	0.156	0.156	0.856(0.420 ~ 1.744)
分化程度	0.706	0.405	3.042	0.081	0.494(0.223 ~ 1.091)
部位	0.554	0.369	2.258	0.133	1.740(0.854 ~ 3.583)
大小	0.733	0.428	2.935	0.087	2.081(0.900 ~ 4.814)
组织学类型	0.921	0.432	4.557	0.033	0.398(0.171 ~ 0.927)
MMR 状态	1.175	0.563	4.347	0.037	0.309(0.102 ~ 0.932)

RR: 相对危险度

MMR 状态、肿瘤分化程度、组织学类型与老年组和非老年组患者预后显著相关 ($P < 0.05$)。多因素分析结果显示: MMR 状态、分化程度为影响老年组患者生存时间的独立因素 ($P < 0.05$); MMR 状态、组织学类型为影响非老年组患者生存时间的独立因素

($P < 0.05$)。见表 2~4。

3 讨论

结直肠癌的发病率及死亡率呈逐渐上升的趋势,其中 MMR 基因的突变或甲基化导致结直肠癌

的发生,这一途径越来越受到重视。MMR 基因的正常表达,可识别并纠正错配的碱基,保持基因转录翻译的稳定性,避免肿瘤的发生^[8]。随着人口老龄化和医疗水平的提高,老年 SCC 患者的数量越来越多,研究 MMR 在老年 SCC 患者中的作用显得非常重要。老年组 MMR 蛋白表达缺失率为 17.71%,低于非老年组的 26.25%,或许是因为非老年组样本量较少的原因,差异无统计学意义,但可反映这有可能是 SCC 患者年轻化趋势的原因之一。相关研究^[9]表明,MMR 蛋白的表达状态与 SCC 患者的临床病理特征有明显的相关性。本研究显示,在老年 SCC 患者中,dMMR 组患者更多见于 II 期、高分化、肿瘤直径 ≥ 5 cm 的患者,更难发生淋巴结转移。dMMR 组的患者发生淋巴结转移的比例要比 pMMR 组低,这与 Park et al^[10] 的研究结果一致,这或许是 dMMR 组患者预后较好的原因之一。

与 pMMR 组患者相比,dMMR 组患者更多为 II 期、高分化的肿瘤,早期及高分化的肿瘤,预后往往较好,这些均可能是 dMMR 组患者预后更好的原因。dMMR 组患者更多为体积较大的肿瘤(直径 ≥ 5 cm),这些患者由于肿瘤体积较大,发生腹痛、排便习惯改变等临床症状和肠穿孔、肠梗阻、出血等并发症的时间较早,更早地发现、及时治疗意味着更好的预后。对于非老年组患者,MMR 表达状态与患者的分期、分化程度、淋巴结转移方面显著相关,与肿瘤直径无明显相关性,这与老年组患者不同。研究^[11]表明,MMR 蛋白与 SCC 患者的生存时间有明显的相关性。Zaanan et al^[12] 认为,dMMR 患者的生存时间显著长于 pMMR 患者,FOLFOX 辅助化疗有益于 dMMR 患者。也有一些学者认为,含 5-Fu 的化疗方案对 dMMR 患者无明显的作用^[13]。本研究显示,MMR 蛋白表达缺失是老年 SCC 患者预后好的指标,Cox 回归分析结果表明:MMR 状态为影响 SCC 患者生存时间的独立因素。两组患者均于术后应用 FOLFOX 方案进行化疗,结果 dMMR 组的 5 年生存率高于 pMMR 组,差异有统计学意义。因此,对于伴有高危因素的老年 II-III 期 SCC 中 MMR 表达缺失的患者,建议应进行术后辅助化疗。对于 MMR 影响 SCC 患者预后的具体机制,仍未完全阐明,有多种观点。Scarpa et al^[14] 认为,相比 MMR 蛋白表达正常的 SCC 患者,MMR 蛋白表达缺失的 SCC 患

者中,免疫监视功能明显增强,可显著影响患者的预后。Zhang et al^[15] 则认为 dMMR 结直肠癌的免疫微环境与 pMMR 的不同。

本研究未将 MMR 蛋白表达状态分别与 II 期、III 期 SCC 患者的临床病理特征及预后的关系进行研究,有待大规模、更为细致的研究验证上述结论。

综上所述,老年 SCC 患者 MMR 蛋白的表达状态与其临床病理特征及预后有明显的相关性,dMMR 组患者更多见于 II 期、高分化、肿瘤直径 ≥ 5 cm 的患者,更难发生淋巴结转移。MMR 状态为影响老年 SCC 患者预后的独立因素,dMMR 组患者较 pMMR 组患者预后更好。

参考文献

- [1] Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2014 [J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(2): 104-17.
- [2] Hashmi A A, Ali R, Hussain Z F, et al. Mismatch repair deficiency screening in colorectal carcinoma by a four-antibody immunohistochemical panel in Pakistani population and its correlation with histopathological parameters [J]. World J Surg Oncol, 2017, 15(1): 116.
- [3] Farchoukh L, Kuan S F, Dudley B, et al. MLH1-deficient colorectal carcinoma with wild-type BRAF and MLH1 promoter hypermethylation harbor KRAS mutations and arise from conventional adenomas [J]. Am J Surg Pathol, 2016, 40(10): 1390-9.
- [4] Lothe R A, Peltomäki P, Meling G I, et al. Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history [J]. Cancer Res, 1993, 53(24): 5849-52.
- [5] Day L W, Velayos F. Colorectal cancer of the elderly [J]. Curr Treat Options Gastroenterol, 2014, 12(3): 269-82.
- [6] Edge S B, Compton C C. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM [J]. Ann Surg Oncol, 2010, 17(6): 1471-4.
- [7] Niessen R C, Berends M J, Wu Y, et al. Identification of mismatch repair gene mutations in young patients with colorectal cancer and in patients with multiple tumours associated with hereditary non-polyposis colorectal cancer [J]. Gut, 2006, 55(12): 1781-8.
- [8] Seifert M, Reichrath J. The role of the human DNA mismatch repair gene hMSH2 in DNA repair, cell cycle control and apoptosis: implications for pathogenesis, progression and therapy of cancer [J]. J Mol Histol, 2006, 37(5-7): 301-7.
- [9] Korphaisarn K, Pongpaibul A, Limwongse C, et al. Deficient DNA mismatch repair is associated with favorable prognosis in Thai patients with sporadic colorectal cancer [J]. World J Gastroen-

- terol,2015,21(3): 926–34.
- [10] Park J W, Chang H J, Park S, et al. Absence of hMLH1 or hMSH2 expression as a stage – dependent prognostic factor in sporadic colorectal cancers [J]. *Ann Surg Oncol*, 2010,17(11): 2839–46.
- [11] Ghanipour L, Jirström K, Sundström 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.
- [12] Zaanani A, Shi Q, Taieb J, et al. Role of deficient DNA mismatch repair status in patients with stage III colon cancer treated with FOLFOX adjuvant chemotherapy: a pooled analysis from 2 randomized clinical trials [J]. *JAMA Oncol*, 2018,4(3): 379–83.
- [13] Sargent D J, Marsoni S, Monges G, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil – based adjuvant therapy in colon cancer [J]. *Clin Oncol*,2010,28(20): 3219–26.
- [14] Scarpa M, Ruffolo C, Canal F, et al. Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancer enhance immune surveillance [J]. *Oncotarget*, 2015,6(41): 43472–82.
- [15] Zhang Y, Sun Z, Mao X, et al. Impact of mismatch – repair deficiency on the colorectal cancer immune microenvironment [J]. *Oncotarget*,2017,8(49): 85526–36.

Expression of hMLH1,hMSH2,hMSH6 in elderly patients with sporadic colorectal cancer and its correlation with prognosis

Zhang Liangliang¹, Song Qian², Shi Hongjian², et al

(¹Dept of General Surgery, ²Dept of Intervene in Blood Vessels, Jiangsu University

Affiliated Wujin Hospital, Changzhou 213002)

Abstract Objective To discuss expression of mismatch repair(MMR) protein in elderly patients with stages II – III sporadic colorectal cancer(SCC) and its correlation with prognosis. **Methods** 232 cases of SCC paraffin specim after surgery were enrolled in this study. Immunohistochemistry was used to detect expression of hMLH1, hMSH2 and hMSH6. The relationship between expression of MMR protein and its clinic pathological features and prognosis in elderly SCC was analyzed. **Results** The missing rate of MMR protein expression was 17. 71%(26/ 152) in elderly patients with SCC. The missing rate of MMR protein expression was 26. 25%(21/80) in non-elderly patients with SCC. There was no significant difference between the two groups ($P=0. 100$). For elderly patients with SCC, the deletion of MMR were significantly different in stage, differentiation degree, tumor diameter, lymph node metastasis and ($P<0. 05$). For non-elderly patients with SCC, the deletion of MMR were significantly different in stage, differentiation degree, lymph node metastasis and ($P<0. 05$). For elderly patients with SCC, the five-year survival rate was 84. 62%(22/26) in the deficient MMR group and 56. 35%(71/126) in the proficient MMR group, the difference was statistically significant ($\chi^2=9. 001, P=0. 003$). For non – elderly patients with SCC, the five-year survival rate was 80. 95%(17/21) in the deficient MMR group and 49. 15%(29/59) in the proficient MMR group, the difference was statistically significant ($\chi^2=6. 991, P=0. 008$). The univariate and multivariate analysis showed that MMR status was an independent factor influencing survival time in patients with elderly patients with SCC. **Conclusion** MMR deletion in elderly patients with SCC is more common in patients with stage II tumors, well differentiated tumors and tumor diameter ≥ 5 cm. The deficient MMR group is more difficult to occur lymph node metastasis. MMR status is an independent factor affecting the prognosis of elderly patients with SCC. The prognosis of the deficient MMR group is better than that of the proficient MMR group.

Key words mismatch repair protein; colorectal carcinoma; elderly; pathological characteristics; prognosis