

结直肠癌组织中 MMR 蛋白表达缺失的影响因素分析

郭源 张龙 张舜 余彦平 吕勇志 李纪鹏

【摘要】 目的 探讨结直肠癌组织中错配修复(MMR)蛋白表达缺失的影响因素。方法 收集 1 560 例结直肠癌患者术中切除的结直肠癌组织进行免疫组化染色,分析结直肠癌组织中 MMR 蛋白表达情况及影响 MMR 蛋白表达缺失的因素。结果 结直肠癌组织中 MMR 蛋白表达缺失率为 20.2%。经单因素分析,结直肠癌组织中 MMR 蛋白表达缺失与患者性别、肿瘤部位、肿瘤类型、T 分期均无关(均 $P > 0.05$),与患者年龄、肿瘤直径、分化程度、N 分期、M 分期、TNM 分期均有关(均 $P < 0.05$)。经多因素分析,肿瘤直径、分化程度(低分化)是结直肠癌组织中 MMR 蛋白表达缺失的独立影响因素,其 *OR* 值(95%*CI*)分别为 3.203(2.430~4.221)、2.091(1.420~3.079)。结论 部分结直肠癌患者中可出现 MMR 缺陷,而肿瘤直径、分化程度是结直肠癌组织中 MMR 蛋白表达缺失的独立影响因素。

【关键词】 结直肠癌 错配修复 影响因素

Analysis of factors influencing the loss of MMR protein expression in colorectal cancer GUO Yuan, ZHANG Long, ZHANG Shun, et al. Graduate School, Xi'an Medical University, Xi'an 710068, China

【Abstract】 Objective To explore the influencing factors of mismatch repair (MMR) protein expression in colorectal cancer tissues. Methods Immunohistochemical staining of colorectal cancer tissues in 1 560 patients with colorectal cancer was performed to analyze the expression of MMR protein and the factors affecting the loss of MMR protein expression in colorectal cancer tissues. Results The MMR protein expression deletion rate in colorectal cancer tissues was 20.2%. After single factor analysis, the loss of MMR protein expression in colorectal cancer tissues was not related to gender, tumor location, tumor type and T stage (all $P > 0.05$). It was related to patient age, tumor diameter, degree of differentiation, N stage, M stage and TNM stage (both $P < 0.05$). After multivariate analysis, tumor diameter and degree of differentiation (low differentiation) were independent influencing factors of MMR protein expression loss in colorectal cancer tissues, and their *OR* values (95%*CI*) were 3.203 (2.430-4.221) and 2.091 (1.420-3.079), respectively. Conclusion MMR deficiency may occur in some patients with colorectal cancer, and tumor diameter and degree of differentiation are independent influencing factors of MMR protein expression loss in colorectal cancer tissues.

【Key words】 Colorectal cancer Defective mismatch repair Influencing factor

结直肠癌是一种高度异质性的恶性肿瘤,其发生、发展过程复杂,涉及多个基因的参与^[1]。错配修复(MMR)基因突变导致的 MMR 缺陷是结直肠癌发生、发展的重要机制^[2-3]。研究表明,MMR 蛋白表达与肿瘤病理及患者预后相关^[4-5]。2017 版美国国家综合癌症网络指南建议,对所有结直肠癌患者进行微卫星不稳定(MSI)/

MMR 检测^[6]。目前研究发现与人类有关的 MMR 有 9 种,其中与结直肠癌发生、发展相关的 MMR 有 4 种,即 MLH1、MSH2、MSH6 和 PMS2^[7]。本文对结直肠癌组织中 MMR 表达情况及影响 MMR 表达缺失的因素进行分析,现将结果报道如下。

1 对象和方法

1.1 对象 选取 2008 年 1 月至 2017 年 12 月在中国人民解放军空军军医大学第一附属医院接受结直肠癌根治术的 1 560 例结直肠癌患者为研究对象,其中男 913 例,女 647 例;年龄 12~92(59.55±13.52)岁。纳入标准:(1)临床病理资料完整;(2)术前未接受过放疗或

DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.13.2019-295

作者单位:710068 西安医学院研究生院普通外科专业(郭源、张龙、张舜、余彦平、吕勇志);中国人民解放军空军军医大学第一附属医院消化外科(李纪鹏)

通信作者:李纪鹏,E-mail:jipengli1974@aliyun.com

其他治疗;(3)无其他肿瘤。所有患者签署知情同意书。

1.2 免疫组化染色 使用全自动免疫组化染色仪(BOND-MAX, 美国 Leica 公司);检测试剂主要有 MLH1 单克隆鼠抗人抗体工作液克隆号 ES05、MSH2 单克隆鼠抗人抗体工作液克隆号 MX061、MSH6 单克隆鼠抗人抗体工作液克隆号 MX056、PMS2 单克隆鼠抗人抗体工作液克隆号 MOR4G,均购自福州迈新生物技术公司。取术中切除的结直肠癌组织样本,10% 甲醛溶液固定,常规连续切片,厚度 4 μ m,脱蜡至水。PBS 冲洗,依地酸钠钙(EDTA)高压热修复 2min,室温下自然冷却 20min,流水冲洗干净。PBS 冲洗 5min \times 3 次,置于 3% 双氧水浸泡 10min,蒸馏水冲洗干净。PBS 冲洗 5min \times 3 次,滴加一抗,连孵育盒放入 37 $^{\circ}$ C 暖箱孵育 1h。PBS 冲洗 5min \times 3 次,滴加二抗,连孵育盒放入 37 $^{\circ}$ C 暖箱孵育 30min。PBS 冲洗 5min \times 3 次,DAB 显色剂显色,PBS 终止显色,流水冲洗 1min。苏木素进行复染,盐酸乙醇用于分化,乙醇及二甲苯分别用于脱水、透明,封片,镜检。阳性细胞判断标准:细胞核呈棕黄色,细胞膜、细胞间质均不着色。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 18.0 统计软件。计数资料用率表示,影响直肠癌组织中 MMR 表达缺失的单因素分析采用 χ^2 检验或 Mann-Whitney U 检验,多因素分析采用 logistic 回归分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 结直肠癌组织中 MMR 表达情况 1 560 例结直肠癌组织中 MMR 表达缺失 315 例(20.2%)。其中 MLH1、MSH2、MSH6、PMS2 单独缺失分别 3、8、17、106 例;MLH1 联合 PMS2、MSH2 联合 PMS2、MSH2 联合 MSH6、MSH6 联合 PMS2 缺失分别 97 例、1 例、67 例、8 例;MSH2、MSH6、PMS2 共同缺失 4 例,MLH1、MSH6、PMS2 共同缺失 3 例;MLH1、MSH2、MSH6、PMS2 共同缺失 1 例。

2.2 影响结直肠癌组织中 MMR 表达缺失的单因素分析 结直肠癌组织中 MMR 表达缺失与患者性别、肿瘤部位、肿瘤类型、T 分期均无关,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$);与患者年龄、肿瘤直径、分化程度、N 分期、M 分期、TNM 分期均有关,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),见表 1。

2.3 影响结直肠癌组织中 MMR 表达缺失的多因素分析 以 MMR 表达缺失为应变变量,以单因素分析结果 $P < 0.05$ 的因素为自变量进行 logistic 回归分析,结果

显示肿瘤直径、分化程度(低分化)是结直肠癌组织中 MMR 表达缺失的独立影响因素,见表 2。

表 1 影响结直肠癌组织中 MMR 表达缺失的单因素分析[例(%)]

项目	<i>n</i>	MMR 表达缺失	χ^2 值	<i>P</i> 值
性别				
男	913	176(19.3)	1.144	>0.05
女	647	139(21.5)		
年龄				
≥ 60 岁	827	126(15.2)	26.832	<0.05
< 60 岁	733	189(25.8)		
肿瘤直径				
≥ 5 cm	705	221(31.3)	99.328	<0.05
< 5 cm	855	94(11.0)		
肿瘤部位				
直肠	486	107(22.0)	1.458	>0.05
结肠	1074	208(19.4)		
肿瘤类型				
浸润型	96	17(17.7)	7.024	>0.05
隆起型	144	39(27.1)		
溃疡型	1210	231(19.1)		
蕈伞型	110	28(25.5)		
分化程度				
高分化	424	85(20.0)	-2.137*	<0.05
中分化	974	175(18.0)		
低分化	162	55(34.0)		
T 分期				
T ₁ ~T ₂ 期	204	36(17.6)	0.943	>0.05
T ₃ ~T ₄ 期	1356	279(20.1)		
N 分期				
N ₀ 期	884	237(26.8)	55.438	<0.05
N ₁ ~N ₂ 期	676	78(11.5)		
M 分期				
M ₀ 期	1448	304(21.0)	8.053	<0.05
M ₁ 期	112	11(9.8)		
TNM 分期				
I~II 期	856	232(27.1)	56.210	<0.05
III~IV 期	704	83(11.8)		

注:* 采用 Mann-Whitney U 检验

表 2 影响结直肠癌组织中 MMR 表达缺失的多因素分析

项目	回归系数	标准误	Wald χ^2 值	<i>P</i> 值	OR 值	95%CI
肿瘤直径	1.164	0.141	68.315	0.000	3.203	2.430~4.221
低分化	0.738	0.970	13.960	0.000	2.091	1.420~3.079
常数项	-1.430	0.136	111.189	0.000	-	-

3 讨论

在世界范围内,结直肠癌发病率居所有恶性肿瘤

的第 3 位,其病死率居所有恶性肿瘤的第 4 位,严重威胁着人类健康^[8]。导致结直肠癌的外在不良因素主要有高脂、低纤维饮食等^[9]。同时,其内在因素也不能忽视。继 1993 年首次发现 MMR 基因以来,越来越多学者探索其与结直肠癌发生、发展的内在联系。在正常机体内,存在着一套完整的修复系统,对维护基因的稳定性和完整性起着重要作用,如 MMR 系统等^[10]。MMR 系统能特异性地发现并矫正 DNA 碱基的错配,避免基因发生突变,防止肿瘤的发生^[11-12]。当 MMR 基因受到外界因素(如生物因素、温度变化等)的干扰会发生突变,不能识别 DNA 复制过程中出现的碱基错配,从而导致 MSI 的发生^[13]。

目前对 MMR 基因的检测方法主要有 DNA 测序法、免疫组化法。DNA 测序法采用美国国立癌症研究所推荐的一组微卫星标记点,即 BAT25、BAT26、D2S123、D5S346 和 D17S250;当 2 个及以上分子标记显示异常为高频 MSI,仅 1 个显示异常为低频 MSI,无异常为微卫星稳定^[14]。免疫组化法则是通过检测 MMR 蛋白表达进行筛查。相比于 DNA 测序法,免疫组化法操作方便、价格实惠,被广泛用于临床^[15]。

相关研究表明,MMR 缺陷会影响肿瘤的生物特征,如好发于右半结肠、倾向于低分化和黏液腺癌、较低的淋巴结转移率及远处转移率^[16-18]。同时检测 MMR 蛋白表达,有利于为结直肠癌患者术后诊疗方案的制定及预后判断提供参考^[19-21]。有文献报道,MMR 正常的结直肠癌患者对程序性死亡受体单抗治疗无效^[22]。本研究结果发现,结直肠癌组织中 MMR 蛋白表达缺失率为 20.2%,肿瘤直径、分化程度是结直肠癌组织中 MMR 表达缺失的独立影响因素。可见,部分结直肠癌患者中可出现 MMR 缺陷,且与肿瘤直径、分化程度等存在一定的关系。检测结直肠癌组织中 MMR 蛋白表达,有助于术后诊疗方案的制定与预后判断,提高结直肠癌的诊疗水平。

4 参考文献

- [1] 李博伦,陈小岚. 结直肠腺瘤发病相关因素及癌变机制的研究进展[J]. 解放军医药杂志, 2015, 27(10):108-111. DOI:10.3969/j.issn.2095-140X.2015.10.029.
- [2] Farchoukh L, Kuan SF, 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):1390-1399. DOI: 10.1097/PAS.0000000000000695.
- [3] Xavier S. Prognostic biomarkers in colorectal cancer: where do we stand?[J]. Virchows Arch, 2014, 464(3):379-391. DOI:10.1007/s00428-013-1532-z.
- [4] 谭学贤,罗秋萍,杨雯,等. 四种错配修复基因蛋白在结直肠癌中的表达及临床意义[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(23):4514-4517. DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.23.026.
- [5] 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. DOI:10.2147/OTT.S117089.
- [6] National Comprehensive Cancer Network. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: colon cancer (version 2, 2017)[EB/OL]. 2017.
- [7] Satoshi S, Moriya I, Hidetaka Y, et al. MBD4 frameshift mutation caused by DNA mismatch repair deficiency enhances cytotoxicity by trifluridine, an active antitumor agent of TAS-102, in colorectal cancer cells[J]. Oncotarget, 2018, 9(14):11477-11488. DOI:10.18632/oncotarget.22484.
- [8] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015[J]. CA Cancer Journal for Clinicians, 2015, 65(1):5-29. DOI:10.3322/caac.21254.
- [9] O'Keefe SJ, Li JV, Lahti L, et al. Fat, fibre and cancer risk in African Americans and rural Africans[J]. Nat Commun, 2015, 28(6): 6342. DOI:10.1038/ncomms7342.
- [10] Bernstein C, Bernstein H, Payne CM, et al. DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis[J]. Mutat Res, 2002, 511(2):145-178. DOI:10.1016/S1383-5742(02)00009-1.
- [11] Richman S. Deficient mismatch repair: Read all about it(Review)[J]. Int J Oncol, 2015, 47(4):1189-1202. DOI:10.3892/ijo.2015.3119.
- [12] Li SKH, Martin A. Mismatch repair and colon cancer: mechanisms and therapies explored[J]. Trends Mol Med, 2016, 22(4): 274-289. DOI:10.1016/j.molmed.2016.02.003.
- [13] Sameer AS, Nissar S, Fatima K. Mismatch repair pathway: molecules, functions, and role in colorectal carcinogenesis[J]. Eur J Cancer Prev, 2014, 23(4):264-257. DOI:10.1097/CEJ.0000000000000019.
- [14] Matsuzaki K, Borel V, Adelman CA, et al. FANCD1 suppresses microsatellite instability and lymphomagenesis Independent of the Fanconi anemia pathway[J]. Genes Dev, 2015, 29(24): 2532-2546. DOI:10.1101/gad.272740.115.
- [15] Frolova AI, Babb SA, Zantow E, et al. Impact of an immunohistochemistry-based universal screening protocol for Lynch syndrome in endometrial cancer on genetic counseling and testing[J]. Gynecol Oncol, 2015, 137(1):7-13. DOI:10.1016/j.ygyno.2015.01.535.
- [16] Li G, Hu F, Yuan F, et al. Intronic and promoter polymorphisms of hMLH1/hMSH2 and colorectal cancer risk in Heilongjiang Province of China[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2015, 141(8): 1393-1404. DOI:10.1007/s00432-014-1898-6.
- [17] Li XX, Workstation P, University SM, et al. Histopathologic fea-

(下转第 1382 页)

- 的指导作用[J]. 临床医学研究与实践, 2018, 3(17): 159-160.
- [7] 郁芳芳, 王兰, 刘澄英, 等. 蒙特利尔认知评估量表在筛查 COPD 患者轻度认知功能障碍的价值[J]. 临床肺科杂志, 2018, 1(11): 2045-2047.
- [8] 张扬, 毕涌, 陈为安, 等. 蒙特利尔认知量表评估帕金森病患者认知功能障碍的信度和效度[C]. 丽水: 2014 年浙江省神经病学学术年会, 2014.
- [9] Demakakos P, Muniz-Terrera G, Nouwen A. Type 2 diabetes, depressive symptoms and trajectories of cognitive decline in a national sample of community-dwellers: A prospective cohort study[J]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0175827. DOI: 10.1371/journal.pone.0175827.
- [10] 李妍平. 2 型糖尿病患者轻度认知功能障碍的随访研究[C]. 昆明: 昆明医学院, 2008.
- [11] Chen J, Zhang J, Liu X, et al. Abnormal subcortical nuclei shapes in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *European Radiology*, 2017, 27(10): 4247-4256. DOI: 10.1007/s00330-017-4790-3.
- [12] Ben AE, Eldor R, Korczyn AD, et al. Type 2 diabetes mellitus and impaired renal function are associated with brain alterations and poststroke cognitive decline[J]. *Stroke*, 2017, 48(9): 2368-2374. DOI: 10.1161/STROKEAHA.117.017709.
- [13] Demakakos P, Muniz-Terrera G, Nouwen A. Type 2 diabetes, depressive symptoms and trajectories of cognitive decline in a national sample of community-dwellers: A prospective cohort study[J]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0175827. DOI: 10.1161/STROKEAHA.117.017709.
- [14] Tumminia A, Vinciguerra F, Parisi M, et al. Type 2 Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease: Role of Insulin Signalling and Therapeutic Implications[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(11): e3306. DOI: 10.3390/ijms19113306.
- [15] Palta P, Carlson MC, Crum RM, et al. Diabetes and Cognitive Decline in Older Adults: The Ginkgo Evaluation of Memory Study[J]. *The Journals of Gerontology Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 2017, 73(1): 123-130. DOI: 10.1093/gerona/glx076.
- [16] 张蕾, 刘军, 严翠丽. 老年 2 型糖尿病患者胰岛素治疗护理管理[C]. 上海: 第三届上海国际护理大会, 2017.
- [17] 赵鹤, 邵华, 牛一民, 等. 糖尿病治疗药物改善阿尔兹海默病患者认知障碍的研究现状 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2017, 33(23): 2493-2496.
- [18] Groeneveld O, Reijmer Y, Heinen R, et al. Brain imaging correlates of mild cognitive impairment and early dementia in patients with type 2 diabetes mellitus[J]. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases*, 2018, 8(2): 1253-1260. DOI: 10.1016/j.numecd.2018.07.008.
- [19] Yaffe K, Blackwell T, Whitmer RA, et al. Glycosylated hemoglobin level and development of mild cognitive impairment or dementia in older women[J]. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, 2006, 10(4): 293-295.
- [20] Zhang JZ, Jing L, Ma AL, et al. Hyperglycemia increased brain ischemia injury through extracellular signal-regulated protein Kinase[J]. *Pathology, Research and Practice*, 2006, 202(1): 31-36. DOI: 10.1016/j.prp.2005.10.002.
- [21] Lachmann G, Feinkohl I, Borchers F, et al. Diabetes, but Not Hypertension and Obesity, Is Associated with Postoperative Cognitive Dysfunction[J]. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 2018, 46(3-4): 193-206. DOI: 10.1159/000492962.

(收稿日期: 2018-12-10)

(本文编辑: 陈丹)

(上接第 1376 页)

- tures and microsatellite instability of sporadic colorectal carcinoma: An analysis of 400 cases[J]. *World Chinese Journal of Digestology*, 2013, 21(12): 1080-1089. DOI: 10.11569/wcj.v21.i12.1080.
- [18] Mohan HM, Ryan E, Balasubramanian I, et al. Microsatellite instability is associated with reduced disease specific survival in stage III colon cancer[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2016, 42(11): 1680-1686. DOI: 10.1016/j.ejso.2016.05.013.
- [19] 秦琼, 应建明, 吕宁, 等. DNA 错配修复与结肠癌预后和疗效预测的相关性[J]. *中华肿瘤杂志*, 2014, 36(11): 844-848. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3766.2014.11.009.
- [20] Whitehall VH, Wynter CV, Walsh MD, et al. Morphological and molecular heterogeneity within nonmicrosatellite instability-high colorectal cancer[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(23): 6011-6014. DOI: 10.1046/j.1523-5394.2002.106009.x.
- [21] Tejpar S, Bertagnolli M, Bosman F, et al. Prognostic and predictive biomarkers in resected colon cancer: current status and future perspectives for integrating genomics into biomarker discovery[J]. *Oncologist*, 2010, 15(4): 390-404. DOI: 10.1634/theoncologist.2009-0233.
- [22] Le DT, Uram J, Wang H, et al. PD-1 Blockade in tumors with Mismatch-Repair Deficiency[J]. *N Engl J Med*, 2015, 372: 2509-2520. DOI: 10.1007/s11725-015-0588-4.

(收稿日期: 2019-01-25)

(本文编辑: 陈丹)