DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.06.005

微卫星不稳定性在大肠癌发生中的作用及其与预后的意义

阎晓初* 陈意生** 柳凤轩 罗元辉*** 鲁 荣** (第三军医大学附属西南医院病理科) 重庆, 400038

提 要 目的: 探讨微卫星不稳定性在大肠癌发生中的作用及其与大肠癌预后的关系。方法: 采用 PCR-SSLP法对 56例大肠癌 D18S34, D17S799, D5S409, TCF-2, p53和 Rb 6个位点微卫星不稳定性进行了检测。结果: 显示大肠癌 MSI总阳性率 44.64%, 其中, HNPCC≥ 2个位点 MSI阳性率 75.00%, 散发性大肠癌≥ 2个位点阳性率 28.85%。MSI阳性大肠癌患者 3 5年生存率高于 MSI阴性患者。结论: MSI可能为大肠癌发生的又一种分子机制。MSI阳性大肠癌生物学行为较好, 预后较佳, 对其检测可能有助于大肠癌预后的判断。

关键词 大肠肿瘤; 微卫星不稳定性; 预后
中图法分类号 R735.34

大肠癌系我国常见的恶性肿瘤之一, 其发生机制较为复杂, 涉及到一系列分子遗传学的改变。最近研究发现遗传性非息肉病性大肠癌 (Hereditary non-polyposis colorectal cancer, HNPCC)的发生与错配修复基因 (Mismatch repair gene)突变引起微卫星不稳定性 (Microsatellite instability, MSI)有关[1], 对于大肠癌 MSI研究国内尚未见文献报道, 为此, 本研究采用 PCR-SSLP法对 56例大肠癌的 MSI进行检测, 探讨 MSI在大肠癌发生中的意义及其与预后的关系。

1 材料与方法

1.1 标本

收集西南医院 1987年 1月至 1996年 2月年间手术切除的大肠癌 56例, 其中新鲜组织 22例, 石蜡组织 34例, 每例同时收集残端正常粘膜组织。所有病例均获得随访结果, 随访时间 20~ 87个月, 平均 45.6个月。经家族史调查确诊为 HNPCC 4例, 散发性大肠癌 52例。

1.2 MSI检测方法

1.2.1 DNA提取 将冰冻新鲜组织和石蜡组织连续切片 10~ 15张, 厚度 5μm, 参照 Zhuang等[2]报道的微切除技术, 收集大肠癌及正常粘膜组织。保证癌组织中癌细胞数至少在 70%以上, 正常大肠粘膜组织中无癌细胞。采用蛋白酶 K消化、苯酚/氯仿抽提法提取基因组 DNA

1.2.2 寡核苷酸引物 由中科院上海细胞所合成。碱基序列为: D18S34(5′-CAG AAA ATT CTC CTG GCT A-3′, 5′-CTC ATG TTC CTG GCA AGA AT-3′); D17S799 (5′-ATT GCC AGC CGT CAG TT-3′, 5′-GAC CAG CAT ATC ATT ATA GAC AA-3′); D5S409(5′-GAA GGG ATG AAG TGT GGA TT-3′, 5′-TCA AGG ACT GTA GGA TGG CA-3′); TCF-2(5′-GAC CCC ACA GCC TAT TCA GA-3′, 5′-TTG ACT GCT GAA CGG CTG CA-3′); P53(5′-AGG GAT ACT ATT CAG CCC GAG GTG-3, 5′-ACT GCC ACT CCT TGC CCC ATT C-3′)和 Rb (5′-CCT ATC TCC GGC TAA ATA C-3′, 5′-AAT TAA CAA GGT GTG GTG G-3′)。

1.2.3 PCR扩增与分析 采用美国 2400型 PCR仪扩增, 反应总体积为 20μl, 根据引物不同设定循环参数, 分别为 94℃, 40~ 60 s, 52℃~ 56℃, 40~ 60 s, 72℃, 60~ 120 s, 共 35~40次循环。取 PCR反应产物 10μl加入 10%变性聚丙烯酰胺凝胶孔中电泳, 电泳条件除 Rb为 250V, 5 h外, 其余均为 100V, 5 h。取下凝胶行银染显色。结果判定: 每例标本中, 肿瘤组织与其相对应的正常组织相比, 出现额外的 DNA等位片段或等位片段出现缺失即为 MSI阳性。

1.3 统计学处理

采用 χ^2 检验和 Kaplan-Meier生存率曲线分析及 Log rank检验。

2 结果

2.1 大肠癌组织中 MSI的发生频率

56例大肠癌中各微卫星位点 MSI检出率, 见图 1 2, 分别为 D18S34 25.00% (14/56)、17S799 21.43% (12/56)、D5S409 16.07% (9/56)、TCF-2 21.43% (12/56)、Rb 17.86% (10/56)及 p53 23.21% (13/56)。综合以上 6个位点分析, 56例大肠癌共检出 MSI 25例, MSI总发生率为 44.64%, 其中仅发生 1个微卫星位点 MSI 7例, 2个或 2个以上位点发生 MSI 18例。HNPCC 4例中, MSI阳性 3例, 占 75.00%, 均为≥ 2个位点阳性; 散发性大肠癌 52例, 1个位点阳性 7例, ≥ 2个位点阳性 15例, 占 28.85%。

2.2 MSI与大肠癌临床病理参数的关系, 见表 1

本组大肠癌中, 不同性别、年龄大肠癌患者间 MSI发生率差异无显著性, MSI发生与肿瘤大小无关, 但与肿瘤发生部位显著相关, 25例 MSI阳性大肠癌中, 右半结肠癌有 18例, 占

* 阎晓初, 男, 35岁, 主治医师, 讲师, 博士研究生
** 基础医学部病理学教研室 *** 消化内科 重庆, 400038

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

72.00% (18/25),左半结肠癌 7例,占 28.00% (7/25),经 χ^2检验两者间相差非常显著($P < 0.01$)。组织学类型:低分化腺癌和粘液腺癌共 21例,MSI阳性 15例,阳性率 71.43%;而 35例高分化和中分化腺癌中,MSI阳性只有 10例,阳性率 28.57%,经统计学处理两组间差异非常显著($P < 0.01$)。MSI阳性大肠癌主要为 Dukes B、C期。

图 1　大肠癌 P53微卫星 DNA不稳定性
M:标准 DNA, N:正常组织, T:癌组织
第 1、3组呈微卫星不稳定性阳性,第 2组呈阴性

Fig 1　MSI at P53 loci in colorectal carcinomas
M: Standard DNA; N: Normal tissue; T: Carcinomas
Group 1, 3 with MSI, group 2 without MSI

图 2　大肠癌 Rb微卫星 DNA不稳定性
M:标准 DNA, N:正常组织, T:癌组织
第 1、2组均呈微卫星不稳定性阳性

Fig 2　MSI at Rb loci in colorectal carcinomas
M: Standard DNA; N: Normal tissue; T: Carcinomas
Group 1, 2 with MSI

表 1　MSI与大肠癌临床病理参数的关系

Tab 1　Relationship between MSI and clinicopathological parameters in colorectal carcinomas

Clinicopathological characteristics	MSI$^-$	MSI$^+$ (1 loci)	MSI$^+$ ($\geqslant$ 2 loci)	Total
Gender				
male	19	3	7	29
female	12	4	11	27
Age($\bar{x}\pm s$)	52.4± 14.0	51.3± 16.1	52.6± 10.6	
Location				
left colon	23	4	3	30
right colon	8	3	15	26
Size				
$\leqslant$ 5.0 cm	16	3	10	29
> 5.0 cm	15	4	8	27
Histological type				
well differentiated	11	0	2	13
moderately differentiated	14	2	6	22
poorly differentiated	3	4	8	15
mucinous	3	1	2	6
Dukes' stage				
A	8	0	1	9
B	8	3	11	22
C	10	4	5	19
D	5	0	1	6

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.3 MSI与大肠癌预后

56例大肠癌经随访观察死亡共 15例,其中 MSI阴性大肠癌中有 11例死亡,占 35.48% (11/31),MSI阳性者死亡 4例,占 16.00% (4/25),经 Log rank检验两者间相差不显著 ($P > 0.05$)。采用 Kaplan-Meier生存率曲线分析,显示 MSI阳性大肠癌患者的预后好于 MSI阴性患者。并计算出 1个位点 MSI阳性大肠癌患者术后 3、5年生存率分别为 83.71%和 63.43%;≥ 2个位点 MSI阳性患者 3、5年生存率分别为 93.44%、83.89%;而 MSI阴性者 3年生存率 71.19%,5年生存率为 58.51%。其中≥ 2个位点 MSI阳性大肠癌 5年生存率较 MSI阴性者显著增高 ($P < 0.05$)。

3 讨论

MSI是由于复制差错引起的 DNA简单重复序列的扩增、丢失或插入,表现为肿瘤组织与其相对应的非肿瘤组织 DNA结构性等位基因的大小发生改变。MSI的发生系由于错配修复基因突变引起基因组 DNA复制精确度降低所致。研究表明 MSI可发生于多种肿瘤[3,4]。大肠癌 MSI研究国外已有报道[1],并且最先发现于遗传性非息肉病性大肠癌 (HNPCC),而国内尚未见文献报道。HNPCC为人类最常见的遗传性疾病之一,约占全部大肠癌的 5% ~ 15%,但在 HNPCC中 MSI的发生频率相当高,约为 70.00% ~ 90.00%,而散发性大肠癌 MSI发生率相对较低,约为 10.00% ~ 15.00%[1],本研究检测 56例大肠癌,MSI总发生率为 44.64%,其中 HNPCC 2个或 2个以上位点 MSI发生率 75.00%,与文献报道相吻合;散发性大肠癌≥ 2个位点 MSI发生率为 28.85%,略高于文献报道频率。造成这种差异的原因可能与受检者种族、地理环境或检测位点的不同有关。长期以来,对于 HNPCC发生分子机制仍不清楚,最近研究发现其发生与复制差错引起的基因组微卫星 DNA不稳定性密切相关[5],而 MSI阳性的大肠癌与 MSI阴性者相比,前者很少发生 K-ras癌基因突变和 p53等抑癌基因突变或缺失,表明这部分癌的发生与癌基因和抑癌基因关系不大[6]。MSI作为 HNPCC和部分散发性结肠癌一种特殊的改变,提示其可能为大肠癌尤其是 HNPCC发生的又一种新的分子机制。

MSI与大肠癌的发生部位、发病年龄有关,Aaltonen等[1]报告 HNPCC中,MSI发生于近端大肠占 62%,远端大肠占 38%。Kim等[7]对散发性大肠癌 MSI检测显示,MSI阳性肿瘤近端大肠占 94%,且 MSI阳性患者平均年龄 60岁,阴性患者 66岁。Patel等[8]研究却认为 MSI发生与大肠癌患者年龄、性别和肿瘤发生部位无关。本研究结果显示,25例 MSI阳性大肠癌中,右半结肠癌占 72.00%,左半结肠癌占 28.00%。在发病年龄上无明显差别,提示 MSI与右半结肠癌有关,它可能为右半结肠癌发生的一种较重要的机制。同时本实验还显示低分化腺癌和粘液腺癌中,MSI阳性率显著高于高、中分化腺癌 ($P < 0.01$),与国外文献报道一致。对于 MSI表现为这些现象的原因目前仍不清楚,尚有待进一步研究。此外,本研究所检测到的 MSI阳性大肠癌主要以 Dukes B期和 C期多见,而本组 Dukes B期为浸润范围在浆膜内的肿瘤,C期均为有淋巴结转移的肿瘤,提示 MSI与大肠癌淋巴结转移与否无关,可能未参与大肠癌的转移。

MSI阳性与阴性的肿瘤有着不同的生物学特征,研究表明许多显示 MSI阳性的肿瘤患者,其预后相对较好[4,9],并发现大肠癌中 MSI阳性者多为二倍体,预后较好;而 MSI阴性者,则常呈异倍体,预后一般较差。并且具有 2个或 2个以上微卫星位点阳性的癌,其预后显著较 1个位点阳性的癌好。因此提出在大肠癌 MSI阳性判断上,呈≥ 2个微卫星标志出现异常时,更有意义。本实验对 56例大肠癌随访观察显示,MSI阳性 (尤其≥ 2个位点阳性)肿瘤 3、5年生存率均高于 MSI阴性肿瘤,提示 MSI阳性大肠癌具有较好的生物学行为,其预后一般较佳,故 MSI检测可能有助于大肠癌预后的判断。

本研究显示 MSI阳性大肠癌组织学类型多为低分化腺癌,但其预后较好,与国外文献报道相符,其原因仍不清楚。一些研究发现 MSI阳性的低分化腺癌,具有间质血管明显减少,常伴有克隆氏病样淋巴细胞浸润,使宿主对癌细胞的免疫反应增强;AgNOR计数癌细胞增殖活性较低;流式细胞计检测 DNA多呈二倍体核型以及很少检测到 p53基因突变等特点[7,9,10]。提出这些改变可能对改善癌的预后具有作用。提示 MSI阳性的低分化腺癌在生长方式、增殖活性、倍体分布和基因突变等方面与其他低分化腺癌不同,因此对其诊断治疗应予以注意。

参考文献

1 Aaltonen L A, Peltomaki P, Mecklin J P, *et al*. Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. Cancer Res, 1994, 54(7): 16445

2 Zhuang Z P, Bertheau P, Emmert Buck M R, *et al*. A microdissection technique for archival DNA analysis of specific

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

cell polulation in lesion < 1 mm in size. Am J Pathol, 1995, 146(3): 620
3 Jonsson M, Johannsson O, Borg A, *et al*. Infrequent occurence of microsatellite instability in sporadic and familial breast cancer. Eur J Cancer, 1995, 31A(13~14): 2330
4 Dosantos N R, Seruca R, Oonstancia M, *et al*. Microsatellite instability at multiple loci in gastric carcinoma: clinicopathologic implication and prognosis. Gastrenterology, 1996, 110(1): 38
5 Kullmann F, Bocker T, Scholmerich J, *et al*. Microsatellite instability-a new aspects in genetics and molecular biology of hereditary nonpolyposis and sporadic colorectal tumors. Z Gastroenterol, 1996, 34(12): 813
6 Ruschoff J, Dietmaier W, Luttges J, *et al*. Poorly differentiated colonic adenocarcinoma, medullary type: clinical, phenotypic, and molecular characteristics. Am J Pathol, 1997, 150(5): 1815
7 Kim H, Jen J, Vogelstein B, *et al*. Clinical and patological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication error in microsatellite sequences. Am J Pathol, 1994, 145(1): 148
8 Patel U, Chen H C, Banerjee S. Dinucleotide repeat polymorphisms at nine loci in sporadic colorectal cancer. Cellular and Molecular Biol Res, 1994, 40(7~8): 683
9 Forster S, Sattler H P, Hack-M, *et al*. Microsatellite instability in sporadic carcinomas of the proximal colon: association with diploid DNA content, negative protein expression of p53, and distinct histomorphologic features. Surgery, 1998, 123(1): 13
10 Goggins M, Offerhaus G J, Hilgers W, *et al*. Pancreatic adenocarcinomas with DNA replication errors (RER+) are associated with wild-type K-ras and characteristic histopathology. Poor differentiation, a syncytial growth pattern, and pushing borders suggest RER+. Am J Pathol, 1998, 152(6): 1501

(收稿: 1998-07-20;修回: 1998-10-15)
(编辑　王　红)

Role of microsatellite instability in occurrence of colorectal carcinoma and its prognostic significance

Yan Xiaochu, Chen Yisheng, Liu Fengxuan, Luo Yuanhui, Lu Rong (Department of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To explore the role of microsatellite instability (MSI) in the occurrence of colorectal carcinoma and the relationship between MSI and prognosis of the carcinoma. **Methods**: MSI at 6 loci of D18S34, D17S799, D5S409, TCF-2, P53 and Rb in 56 cases of colorectal carcinoma were detected with RCR-SSLP. **Results**: The total positive rate of MSI was 44.64%. The 3- or 5-year survival rate was higher in the cases with MSI than in those without. **Conclusion**: MSI may be another molecular mechanism of occurrence of colorectal carcinoma. The cases of colorectal carcinoma with MSI have better biological behavior and outcome. Therefore, the detection of MSI might be useful for prediction of the prognosis of colorectal carcinoma.

Key words colorectal carcinoma; microsatellite instability; prognosis

(上接 479页)

作出诊断,采取简单的抗感染、口服中药等对症治疗,缺乏全面细致的分析。③ 全面检查不仔细,过分依靠单一辅助检查:本组病例中 X线误诊达 11例。肺结核与肺癌的 X线有很多相似之处,加之老年肺癌并存症状多而掩盖了肺癌的症状造成误诊。④ 临床各科室联系会诊不够:病人在首诊科室就诊,而非专科医生容易将老年肺癌的继发和转移症状或早期引发的邻近器官的反应病症作为主要诊断,忽视其原发疾病。

针对以上分析,我们提出凡有下列情况之一者,都应想到老年肺癌的可能:① 近期发生原因不明的咳嗽、咯血、胸痛、声嘶,按一般抗感染治疗无效果者。② 近期出现颈部、锁骨上窝及腋下淋巴结肿大者。③ 近期突然出现头痛、呕吐、腰痛、关节疼痛的患者,考虑是否以转移灶为首发症状。④ 过去曾有过肺结核、支气管扩张等病史,按抗痨治疗无效者。⑤ 近期出现的一系列肿瘤副症,如:黑棘皮病、皮肌炎、植物神经功能亢进,男性乳房发育等。

关键词　肺肿瘤,误诊
中图法分类号　R734.2

参考文献

1 栗安刚,彭培立,王基清.96例老年人肺癌误诊分析.中原医刊,1996, 23(12): 45
2 张珍华,陈　韧.老年肺癌误诊原因分析.实用老年医学,1996, 10(2): 90

(收稿: 1998-02-16;修回: 1998-09-20)
(编辑　刘　鹏)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net