

# 结直肠癌 MMR 免疫组化异常表达的解读

王云帆<sup>1</sup>, 薛卫成<sup>2</sup>

关键词:结直肠肿瘤;DNA 错配修复;免疫组织化学

中图分类号:R 735.3 文献标志码:A

文章编号:1001-7399(2024)06-0572-04

doi:10.13315/j.cnki.cjcep.2024.06.003

结直肠癌是最常见的消化道恶性肿瘤,发病率和病死率呈逐年上升趋势。2022 年全国癌症统计数据显示,我国结直肠癌的发病率和病死率分别位居恶性肿瘤的第 2 位和第 5 位。病理检查是结直肠癌诊治必不可少的步骤,大多数结直肠癌在形态学上以普通型腺癌为主,诊断时通常无需借助辅助手段,而一些少见特殊类型的结直肠癌,如低分化神经内分泌癌、肉瘤样癌等,常需借助免疫组化标志物协助确诊。同时还有一些特殊的组织学类型,如黏液腺癌、印戒细胞癌、髓样癌、微乳头状腺癌等与转移性腺癌易混淆,需要借助免疫组化标志物来确定来源。随着对结直肠肿瘤的深入探究、靶向治疗和免疫治疗在结直肠癌中的广泛应用等,一些生物学标志物对临床治疗方案的选择以及林奇综合征的筛选具有越来越重要的价值。因此,免疫组化检查在结直肠癌患者的全流程管理中发挥着越来越重要的作用。关于常用生物学标志物,尤其是 DNA 错配修复(DNA mismatch repair, MMR)蛋白的一些少见表达的解读,病理和临床医师在临床实践中还存在一些困惑,本文试图给予梳理和解读,以提高大家的认识。

## 1 MMR 检测的意义

正常机体细胞每天都在凋亡,同时也有新的细胞形成,以维持机体平衡。在细胞的形成过程中涉及细胞的分裂增殖,而分裂增殖过程中又涉及 DNA 的复制。MMR 是纠正 DNA 复制过程中发生突变的一个重要生理过程,确保复制

过程的“保真性”。MMR 基因的产物是错配修复蛋白,通过在 DNA 复制过程中修复错配的碱基使 DNA 精确复制。MMR 基因胚系/体细胞突变和 MLH1 基因启动子甲基化可导致相应的 MMR 蛋白表达缺失或者无功能,即 MMR 功能缺陷(deficient MMR function, dMMR),进而引起 DNA 复制错误的累积→基因组的不稳定→肿瘤的发生。MMR 蛋白作为异二聚体结合,对 MMR 过程的正确功能至关重要,其中 MLH1 和 MSH2 是形成异源二聚体所必需的主体蛋白。PMS2 和 MSH6 是配体蛋白,且 PMS2 只能与 MLH1 形成异源二聚体,MSH6 只能与 MSH2 形成异源二聚体。但是,除了 PMS2 和 MSH6,MLH1 和 MSH2 还可以与其他 MMR 蛋白(即 MSH3、MLH3 和 PMS1)形成异源二聚体。

MMR 蛋白检测具有重要的临床意义,在预后判断方面,dMMR/微卫星高度不稳定型(MSI-H 型)II 期结直肠癌患者预后较好。几乎所有林奇综合征筛查指南均提倡用免疫组化法检测 dMMR。对于符合家系诊断标准的先证者的正常细胞进行 MMR 蛋白检测<sup>[1]</sup>,如果出现蛋白表达丢失则需进行 DNA 外显子测序或 DNA 片段缺失分析。对于出现胚系突变的病例家系成员进行遗传突变检测,有遗传突变的成员则需进入突变携带者的管理流程,无突变的成员则参考一般人群筛查。大量临床研究已经证实,通过免疫组化染色检测 MMR 蛋白表达模式可以预测癌症患者对常规化疗和新型免疫治疗的临床反应,尤其是新辅助免疫治疗已经成为结直肠癌治疗领域新的研究热点,尤其需要通过 MMR 蛋白检测来筛选获益人群。此外,dMMR 检测在其他情况下也可能起作用,如无蒂锯齿状病变伴异型增生时,常常表现为 MLH1 蛋白表达缺失。

目前主要通过免疫组化联合检测 MLH1、MSH2、MSH6、PMS2 来判断错配修复状态。免疫组化检测不仅对预测 dMMR 的敏感性高,还可以指示何种 MMR 蛋白发生缺陷,并且较其他方法更方便、经济实用。因此病理医师要熟悉 MMR 免疫组化的异常表达模式和后续处理。正常情况下 4 个抗体均呈核阳性,MLH1 和 PMS2 表达缺失是结直肠癌和子宫内膜癌中最常见的异常 MMR 表达模式,这可能由于 MLH1 的失活(常见)或突变(不常见)而导致。第二种常见的模式是 MSH2 和 MSH6 同时表达缺失,也有一些少见的 MMR 异常表达情况,如 PMS2 单独缺失、MSH6 单独缺失等。

## 2 结直肠癌中少见的 MMR 异常表达模式

### 2.1 PMS2 单独缺失

在 MMR 中,所有遗传性非息肉病性结直肠癌(hereditary non-polyposis colorectal cancer, HNPCC)

接受日期:2023-12-06

基金项目:北京大学首钢医院科研与发展基金

作者单位:<sup>1</sup> 北京大学首钢医院病理科/北京大学首钢医院结直肠肿瘤诊疗中心,北京 100144

<sup>2</sup> 北京大学肿瘤医院暨北京市肿瘤防治研究所病理科/恶性肿瘤发病机制及转化研究教育部重点实验室,北京 100142

作者简介:王云帆,女,硕士,主任医师。E-mail: wangtaozyy@126.com

薛卫成,男,博士,主任医师,通讯作者。E-mail: xuewc2004@aliyun.com

家族的 MSH2 和 MLH1 基因编码区的胚系突变高达 45% ~ 64%。PMS2 是人类错配修复基因中的重要成员,位于 7 号染色体上。其与 MLH1 蛋白形成活性蛋白复合物,编码在修复 DNA 中起重要作用的蛋白质。

PMS2 染色的单独缺失是结直肠癌中一种不常见的免疫表型(图 1),基于人群队列的结直肠癌免疫组化分析研究表明,肿瘤中 PMS2 蛋白单独丢失在结直肠癌中发生率仅为 0.5% ~ 1.5%<sup>[2-3]</sup>。PMS2 染色单独缺失的结直肠癌可能比其他微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)的肿瘤表现出较低频率的 MSI 组织学特征和更具侵袭性的行为。此外,由 PMS2 突变引起的林奇综合征具有一些不寻常的临床特征,包括较 MLH1 或 MSH2 突变者具有更低的结直肠癌终生风险,较 MLH1 或 MSH2 突变者具有更低的罹患结肠外肿瘤的风险,这增加了将这些患者与散发性结直肠癌患者鉴别的难度。而且对于 PMS2 突变携带者的监测指南也略有差异,即从 30 岁开始进行结直肠监测,而不是 25 岁。此外,预防性切除女性 PMS2 突变携带者的子宫和卵巢似乎并不可取。综上,对所有新诊断的结直肠癌中 MMR 缺陷病例进行普遍筛查是非常必要的。

人们普遍认为,MLH1 基因突变导致主体蛋白 MLH1 自身降解,同时伴随配体蛋白 PMS2 的继发性降解,相反 PMS2 突变可能仅出现 PMS2 的降解,而不会导致配对主体蛋白的降解。因此,MLH1 和 PMS2 的表达缺失通常表明 MLH1 发生了改变(MLH1 启动子区域的体细胞甲基化或 MLH1 胚系或体细胞突变),而 PMS2 表达单独缺失通常表明 PMS2 存在潜在的胚系突变。但并非完全如此,一部分 PMS2 染色单独缺失是由于 MLH1 胚系突变产生了无功能的 MLH1 蛋白,该蛋白不能与 PMS2 正确结合,而非 PMS2 胚系突变导致。更为复杂的是,高达 30% 的 PMS2 染色单独缺失的病例并未检测到 PMS2 或 MLH1 胚系突变,而是由 PMS2 体细胞的基因失活所引起<sup>[4]</sup>。

免疫组化 PMS2 单独缺失机制非常复杂,代表了复杂的分子异质性。因此在 PMS2 表达单独缺失的情况下,不能排除 MLH1 异常,如果确定是 MLH1 启动子超甲基化,可以避免进行不必要的胚系检测。

**2.2 MSH6 单独缺失** MSH6 蛋白全称为 MutS 蛋白同源体 6(MutS homolog 6)。在 MMR 中,MSH6 与 MSH2 蛋白结合,形成 MutS $\alpha$  复合物,发挥 DNA 碱基配对错误修复功能。结直肠癌中 MSH6 蛋白表达单独缺失的频率在 1.9% ~ 14.3% 之间<sup>[5-6]</sup>。不同研究中频率的变化可归因于研究设计的不同、研究的人群以及定义 MSH6 缺失的标准不同。

MSH2/MSH6 形成异源二聚体,因此 MSH2 和 MSH6 同时缺失表明 MSH2 胚系突变,而 MSH6 单独缺失通常是由 MSH6 突变所引起。但是有研究发现 MSH6 单独缺失常表现为异质性模式,这种异质性表现为肿瘤不同区域内染色突然丧失,紧邻着染色保留区域。通过比较不同肿瘤区域的 MSI 状态和 DNA 聚合酶突变的测序发现,MSH6 免疫组化缺失区域基因型为 MSI-H,而且其分子机制是 MLH1 高度甲基化或 MLH1/PMS2 基因胚系突变,而非因为 MSH6 的改变。此外有些病例在 MSH6 缺失区发现存在 POLD1 核酸外切酶结构域体细胞突变。推测 DNA 聚合酶 POLE 或 POLD1 的核酸外切酶结构域的突变引起 DNA 合成过程中的校对受损,从而导致突变率显著增加,MSH6 发生继发性体细胞突变<sup>[7]</sup>。研究结论是,结直肠肿瘤中 MSH6 的这种异质性染色通常与其他 MMR 基因(如 MLH1 或 PMS2)或 DNA 修复基因(如 DNA 聚合酶)的异常相关,并不表明 MSH6 基因有胚系突变。因此当观察到 MSH6 染色异常表达时,应附以评论,说明这种模式通常不表明有基因胚系突变,从而避免对非疑为林奇综合征的患者进行额外的检测以及引起不必要的焦虑。

此外新辅助治疗后切除结直肠癌样本常发生 MSH6 单独缺失,可表现为 MSH6 的异质性或克隆性染色缺失,而其

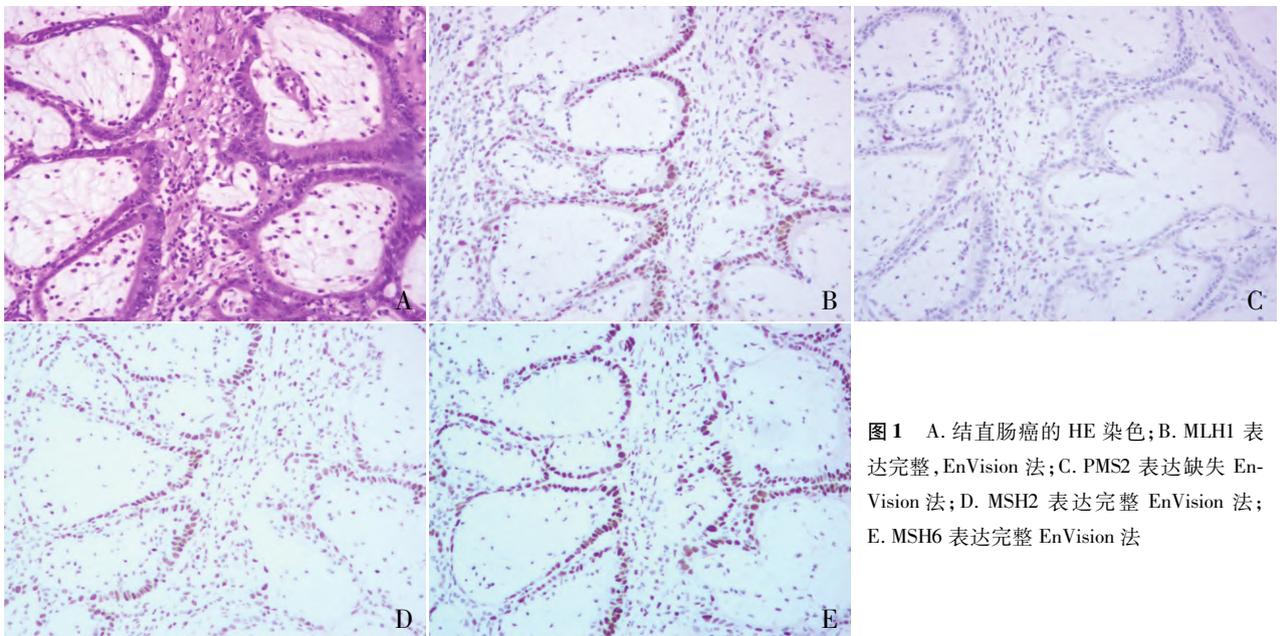


图 1 A. 结直肠癌的 HE 染色; B. MLH1 表达完整, EnVision 法; C. PMS2 表达缺失 En-Vision 法; D. MSH2 表达完整 EnVision 法; E. MSH6 表达完整 EnVision 法

中部分患者术前活检 MSH6 呈弥漫强阳性(即无缺失)<sup>[8]</sup>。新辅助治疗诱导 MSH6 免疫组化表达缺失的机制尚不清楚,可能是治疗诱导的突变、表观遗传变化(如 DNA 甲基化)或细胞周期调节失调引起的。这也从侧面反映了术前活检标本评估肿瘤 MMR 状态的必要性。

**2.3 MMR 蛋白表达的异质性** 肿瘤异质性是指不同的肿瘤细胞可以表现出不同的形态和表型特征,包括细胞形态、基因表达、代谢、增殖和转移潜能。这种现象既可发生于肿瘤之间(肿瘤间异质性),也可发生于肿瘤内部(肿瘤内异质性)。肿瘤内异质性是指肿瘤内的细胞由于分子变化和克隆选择的逐步累积所驱动的癌症发展过程而具有高度多样性,肿瘤间的异质性是指患者体内或不同患者肿瘤间的分子改变。MSI 是结直肠癌发生的早期事件,异质性小。2016 年 Haraldsdottir 等<sup>[9]</sup>研究 50 例 dMMR 的原发性结直肠癌与其相应区域淋巴结或转移性肿瘤之间的 MMR 免疫组化结果完全一致。这表明使用转移组织来识别 dMMR 肿瘤患者,无论是筛查林奇综合征还是协助选择治疗方法均可行。基于该研究结果,NCCN 指南建议对转移性结直肠癌在不可获取原发肿瘤的情况下,可用转移组织进行 MMR 检测。

在临床实践中,约 30% 的 dMMR 结直肠癌患者对免疫检查点抑制剂(ICI)原发耐药,另外,相当一部分患者在初始获益后继发耐药,反映了这类肿瘤确实存在异质性可能,肿瘤异质性是影响 ICI 疗效的一个关键机制。目前关于 MSI 或 MMR 检测瘤内和瘤间异质性及其在肿瘤生长过程中可能的变异方面的数据较少。在有关 MMR 蛋白表达异质性的研究中,11.9% 的结直肠癌患者原发灶和转移灶 MMR 状态不一致,腹膜和肝转移患者更可能存在 MMR 状态异质性。原发灶为 dMMR 而转移灶为错配修复完整(mismatch repair proficiency, pMMR)的可能性相对增高,转移灶 MMR 状态不

一致可能与原发性或获得性 ICI 耐药有关,因此如果原发灶为 dMMR,对转移灶进行再分析可能很有价值。

虽然 MMR 的瘤内异质性表达是一种罕见现象,但正确识别以防止假阳性或假阴性评估具有重要意义。MMR 的异质性表达模式包括腺内型、克隆型和区域型(图 2、3),多数情况下同一肿瘤中,不同的异质性表达模式共存,累及的范围也不同<sup>[10-11]</sup>。在异质性表达的蛋白中,MSH6 和 PMS2 比例较高,其中 MSH6 的异质性常表现为克隆性。

对 5 例存在 MMR 异质表达病例的异质性表达区域分别进行 MSI 和 NGS 检测,发现 4 例 MMR 蛋白缺失区均为 MSI-H,剩余 1 例无论是缺失区还是保留区均为微卫星稳定(microsatellite stability, MSS)。异质性表达可能与 MLH1 启动子的异质性甲基化、异质区域内的 DNA 含量存在差异有关,也可能与肿瘤分化程度相关<sup>[12]</sup>。因此,对于肿瘤表现出异质性染色区域不应被视为 MMR 免疫组化完整/保留或人工误差。尤其是 MSH6 在肿瘤中经常发生异质性。总之,MMR 蛋白的异质性染色模式可能导致结果的错误判读。这也是常规病理实验室只进行免疫组化检测的主要风险,即把局灶性、异质性或弱染色模式错判为 pMMR。因此强烈建议使用 MSI 和 MMR 蛋白同时检测方案。

**3 MMR 蛋白表达与分子检测不一致问题**

MSI 多由 MMR 蛋白表达缺失导致的 MMR 功能缺陷所致,因此通过检测 MMR 蛋白缺失可以间接反映 MSI 状态。但是免疫组化检测 MMR 蛋白表达与基于 DNA 分析检测 MSI 状态是两个不同层面、不同靶点的检测,两者作为评估相关生物学效应的不同检测方法,多数情况下具有高度一致性,但仍有 1% ~ 10% 患者出现 MMR 蛋白和 MSI 检测不一致情况<sup>[13]</sup>。

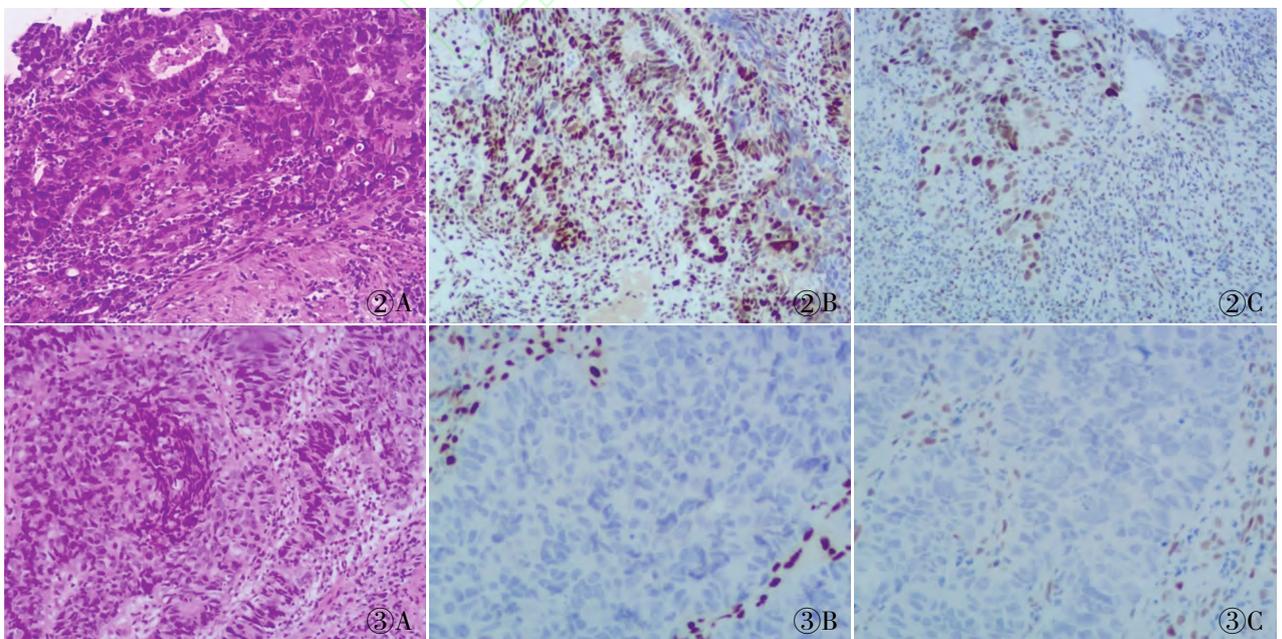


图 2 区域型异质性表达模式:A. 分化好的区域;B. MLH1 表达完整,EnVision 法;C. PMS2 表达完整,EnVision 法

图 3 区域型异质性表达模式:A. 分化差的区域;B. MLH1 表达缺失,EnVision 法;C. PMS2 表达缺失,EnVision 法

最常见的不一致为免疫组化检测 MSH6 表达缺失,但 MSI 检测为 MSS,其原因是 MSH3 可以替代 MSH6 的功能,部分活化 MMR 系统,从而保留 MSS 状态。另一种常见情况是 MLH1 免疫组化表达完整,其实应为假阳性,MLH1 错义突变编码无功能蛋白,因此肿瘤为 MSI-H。或者由 4 种基因以外的其他基因引起的 MSI,如 POLE, POLD。

美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准免疫检查点抑制剂治疗 dMMR 或 MSI-H 的晚期实体瘤患者。但是对于检测手段并未做相应推荐,当出现 MMR 和 MSI 检测不一致,是否适用免疫治疗? 为了解答该问题,美国病理学家学会 (CAP) 召集了一个专家工作组,包括分子病理学家协会、美国临床肿瘤学会和患者权益组织合作制定了免疫检查点抑制剂治疗中的 MMR 和 MSI 检测指南。指南第一条强烈建议,对于正在考虑进行免疫检查点抑制剂治疗的结直肠癌患者,病理学家应使用免疫组化来确定 MMR 和 (或) PCR 来确定 MSI。虽然这些方法是首选,但已被验证为 dMMR 的 NGS 检测也可用于确定 MSI 状态,以确定免疫检查点抑制剂是否适用于这种癌症类型。在这种情况下,专家小组成员特别强调 NGS 检测“必须针对 MMR 免疫组化或 PCR 的 MSI 进行验证,并且必须显示出等效性”。但是对于子宫内膜癌患者,应使用免疫组化来确定 MMR,而非使用 PCR 或 NGS 来确定 MSI。该指南强调了除结直肠癌之外,还没有证据支持使用广泛的 NGS 测试来检测微卫星状态的立场,即这些检测方法并非可以互换。

当出现不同检测方法之间结果不一致时,CAP 建议首先应对不一致结果进行审查,以确保不一致结果不是判读错误所导致。如果采用的任何方法产生不确定的结果,病理学家应该采用替代技术或在不同的肿瘤块上重复相同的技术。实验室应该对不确定的病例有一个强有力的同行评审程序。同时建议如果 MMR 免疫组化出现克隆性缺失,病理学家应该通过 PCR 专门对 MMR 蛋白免疫组化表现异质性的区域进行显微切割后行 MSI 检测。最后 CAP 建议如果出现不一致的结果,病理学家应该将免疫组化证实的 dMMR 或 NGS/PCR 证实的 MSI-H 均解释为阳性结果,从而使患者有机会接受免疫治疗<sup>[14]</sup>。

总之,MMR 蛋白检测是筛查林奇综合征以及预测肿瘤免疫治疗疗效的关键生物学标志物,病理医师要重视并加强相关培训,提高判读的准确性和重复性,而且不同缺失模式背后的分子机制往往非常复杂,加强临床与病理医师的沟通合作可能更有益于真实世界的探索。肿瘤异质性的存在使免疫组化检测 MMR 和分子检测 MSI 必然存在不一致性,在实际临床中,MMR 和 MSI 联合筛查可能提高阳性检出率,以便让更多患者获得更大的临床效益。

#### 参考文献:

[1] Stoffel E M, Mangu P B, Limburg P J, *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 Oncol Pract*, 2015,11(3):e437 - e441.

- [2] Ten Broeke S W, Brohet R M, Tops C M, *et al.* Lynch syndrome caused by germline PMS2 mutations: delineating the cancer risk [J]. *J Clin Oncol*, 2015,33(4):319 - 325.
- [3] Sheng X, Zhou H H, Zhou X Y, *et al.* Germline mutation analysis of hPMS2 gene in Chinese families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2010,16(30):3847 - 3852.
- [4] Alpert L, Pai R K, Srivastava A, *et al.* Colorectal carcinomas with isolated loss of PMS2 staining by immunohistochemistry[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2018,142(4):523 - 528.
- [5] Moreno E, Rosa-Rosa J M, Caniego-Casas T, *et al.* Next generation sequencing to decipher concurrent loss of PMS2 and MSH6 in colorectal cancer[J]. *Diagn Pathol*, 2020,15(1):84.
- [6] Giráldez M D, Balaguer F, Bujanda L, *et al.* MSH6 and MUTYH deficiency is a frequent event in early-onset colorectal cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2010,16(22):5402 - 5413.
- [7] Chen W, Pearlman R, Hampel H, *et al.* MSH6 immunohistochemical heterogeneity in colorectal cancer: comparative sequencing from different tumor areas[J]. *Hum Pathol*, 2020,96:104 - 111.
- [8] Bao F, Panarelli N C, Rennert H, *et al.* Neoadjuvant therapy induces loss of MSH6 expression in colorectal carcinoma[J]. *Am J Surg Pathol*, 2010,34(12):1798 - 1804.
- [9] Haraldsdottir S, Roth R, Pearlman R, *et al.* Mismatch repair deficiency concordance between primary colorectal cancer and corresponding metastasis[J]. *Fam Cancer*, 2016,15(2):253 - 260.
- [10] He W Z, Hu W M, Wang F, *et al.* Comparison of mismatch repair status between primary and matched metastatic sites in patients with colorectal cancer[J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2019,17(10):1174 - 1183.
- [11] Huang Q, Yu T, Li L, *et al.* Intraindividual tumor heterogeneity of mismatch repair status in metastatic colorectal cancer[J]. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2023,31(2):84 - 93.
- [12] Joost P, Veurink N, Holck S, *et al.* Heterogenous mismatch-repair status in colorectal cancer[J]. *Diagn Pathol*, 2014,9:126.
- [13] Evrard C, Tachon G, Randrian V, *et al.* Microsatellite instability: diagnosis, heterogeneity, discordance, and clinical impact in colorectal cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2019,11(10):1567.
- [14] Bartley A N, Mills A M, Konnick E, *et al.* Mismatch repair and microsatellite instability testing for immune checkpoint inhibitor therapy: guideline from the college of American pathologists in collaboration with the association for molecular pathology and fight colorectal cancer[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2022,146(10):1194 - 1210.