

不同错配修复状态结直肠癌患者临床病理特征及与KRAS/NRAS/BRAF基因突变的相关性

余金川^{1,2,3}, 肖雪雪^{1,2,3}, 何伟莹^{1,2,3}, 杨亚楠^{1,2,3}, 岳君秋^{1,2,3}

Clinicopathological Characteristics of Colorectal Cancer Patients with Different Mismatch Repair Statuses and Their Correlation with KRAS/NRAS/BRAF Gene Mutations

YU Jinchuan^{1,2,3}, XIAO Xuexue^{1,2,3}, HE Weiyang^{1,2,3}, YANG Yanan^{1,2,3}, YUE Junqiu^{1,2,3}

1. Department of Pathology, Hubei Cancer Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430079, China; 2. Hubei Provincial Clinical Research Center for Colorectal Cancer, Wuhan 430079, China; 3. Wuhan Clinical Research Center for Colorectal Cancer, Wuhan 430079, China

Corresponding Author: YUE Junqiu, E-mail: yuejunqiu@hotmail.com

Abstract: Objective To investigate the clinicopathological characteristics of colorectal cancer patients with different mismatch repair (MMR) statuses and their correlation with KRAS/NRAS/BRAF (KRB) gene mutations. **Methods** The clinicopathological data of 477 patients with colorectal cancer were collected, and MMR, microsatellite instability (MSI), and KRB status were detected via immunohistochemistry (IHC), PCR-capillary electrophoresis, and next-generation sequencing (NGS), respectively. The clinicopathological features of patients with different MMR statuses and correlations with KRB mutations were analyzed. **Results** Compared with the patients in the pMMR group, the patients in the classical dMMR group were younger, included more females, and exhibited more tumors in the right colon, mostly mucinous adenocarcinoma and poorly differentiated tumors (all $P<0.05$). The tumors in the nonclassical dMMR group were commonly found in the right colon and were prone to special histologic types (all $P<0.05$). MLH1-PMS2 codeletion, BRAF mutation, and KRAS G13 codon mutation were common in patients in both the classical and the nonclassical dMMR groups (both $P<0.05$). The results of MMR IHC (100%) were highly consistent with those of MSI PCR (99.1%). Patients in the classical dMMR group with KRAS mutations were younger, included more males, and were prone to specific histologic types, but distant metastasis was rare (all $P<0.05$). Conversely, lymph node metastasis was rare in patients in the nonclassical dMMR group with KRAS mutations ($P=0.005$). The mutation rate of the MSH6 gene was relatively high in the nonclassical dMMR group ($P=0.002$), and all patients presented complete deletion of MLH1-PMS2 combined with nonclassical expression of MSH6 (100%). Five patients with medullary carcinoma components had complete deletions of MLH1-PMS2. Among the five patients, three had combined nonclassical expression of MSH2/MSH6. Two of the three patients carried the MSH6 gene c.3261 locus mutation. **Conclusion** The clinicopathologic features of patients with classical/nonclassical dMMR colorectal cancer differ from those of patients with pMMR, and MMR IHC could be used to predict effectively the MSI status. The clinicopathologic features differ between classical and nonclassical dMMR colorectal cancer patients with KRAS mutations, but both groups present codeletion of MLH1-PMS2, BRAF mutation, and KRAS G13 codon mutation. In patients with nonclassical dMMR, complete deletion of MLH1-PMS2 combined with nonclassical expression of MSH6 is common. Mutations in the MSH6 gene may play a key role in the

development of colorectal cancer with medullary carcinoma components.

Key words: MMR; KRAS/NRAS/BRAF; Colorectal cancer; Clinicopathologic features

Funding: Health Research Fund of Hubei Province (No. WJ2019H124); Jingjian-Tongshu Microsatellite Instability Research Fund Project, 2020 (No. JJTS2020-017); Biomedical Center Special Research Fund Project of Hubei Cancer Hospital (No. 2022SWZX24)

收稿日期: 2024-02-29; 修回日期: 2024-08-18

基金项目: 湖北省卫生健康科研基金 (WJ2019H124); 2020精鉴·桐树微卫星不稳定研究基金 (JJTS2020-017); 湖北省肿瘤医院生物医学中心专项科研基金 (2022SWZX24)

作者单位: 1. 430079 武汉, 华中科技大学同济医学院附属肿瘤医院 (湖北省肿瘤医院) 病理科; 2. 430079 武汉, 湖北省结直肠癌临床医学研究中心; 3. 430079 武汉, 武汉市结直肠癌临床医学研究中心

通信作者: 岳君秋 (1977-), 女, 博士, 主任医师, 主要从事结直肠癌病理诊断研究, E-mail: yuejunqiu@hotmail.com, ORCID: 0000-0002-1984-8445

作者简介: 余金川 (1998-), 女, 硕士, 医师, 主要从事结直肠癌病理诊断研究, ORCID: 0000-0002-8378-2591

Competing interests: The authors declare that they have no competing interests.

摘要: **目的** 探究不同错配修复 (MMR) 状态下结直肠癌患者的临床病理特征及与KRAS/NRAS/BRAF (KNB) 基因突变的相关性。**方法** 收集477例结直肠癌患者临床病理资料, 采用免疫组织化学染色 (IHC)、PCR-毛细管电泳法、二代测序技术 (NGS) 分别检测MMR、微卫星不稳定性 (MSI) 及KNB状态, 分析不同MMR状态分组下患者临床病理特征及与KNB突变的相关性。**结果** 与pMMR组相比, 经典dMMR组患者年龄小、女性多、右半结肠常见、多为黏液腺癌且分化差 (均 $P<0.05$); 非经典dMMR组患者右半结肠常见, 且易见特殊组织学类型 (均 $P<0.05$)。经典/非经典dMMR组患者均常见MLH1-PMS2共缺失、BRAF突变和KRAS G13密码子突变 (均 $P<0.05$), 且MMR IHC与MSI PCR结果高度一致 (分别为100%和99.1%)。经典dMMR组KRAS突变的患者年龄小、男性多、易见特殊组织学类型, 但远处转移少见 (均 $P<0.05$), 而非经典dMMR组KRAS突变的患者淋巴结转移少见 ($P=0.005$)。非经典dMMR组患者中MSH6基因突变率较高 ($P=0.002$), 均为MLH1-PMS2完全缺失合并MSH6非经典表达 (100%)。5例含髓样癌成分的患者均存在MLH1-PMS2完全缺失, 其中3例合并MSH2/MSH6非经典表达, 这3例中有2例携带MSH6基因c.3261位点突变。**结论** 经典/非经典dMMR结直肠癌患者具有不同于pMMR患者的临床病理特征, MMR IHC检测可很好预测MSI状态。KRAS突变的经典/非经典dMMR结直肠癌患者之间临床病理特征不同, 但均常见MLH1-PMS2共缺失、BRAF突变和KRAS G13密码子突变。非经典dMMR患者常见MLH1-PMS2完全缺失合并MSH6非经典表达模式。MSH6基因突变可在部分含髓样癌成分的结直肠癌发生中起关键作用。

关键词: MMR; KRAS/NRAS/BRAF; 结直肠癌

癌; 临床病理特征

中图分类号: R735.3⁺5

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



0 引言

肿瘤异质性和化疗耐药性被认为是结直肠癌诊断和治疗的两大障碍^[1-2]。错配修复 (Mismatch repair, MMR) 蛋白表达模式、微卫星不稳定性 (Microsatellite instability, MSI) 状态以及KRAS/NRAS/BRAF (KNB) 突变情况是指导结直肠癌治疗的关键因素^[2-3]。错配修复系统作为重要的DNA修复机制, 主要依赖于MSH2、MSH6、MLH1、PMS2四个关键基因^[4-5]。错配修复完整 (Mismatch repair proficient, pMMR) 指DNA错配修复功能正常, MMR蛋白表达阳性。错配修复缺陷 (Mismatch repair deficiency, dMMR) 指DNA错配修复功能缺陷, MMR蛋白表达阴性。错配修复缺陷会引起MSI^[6], 这是结直肠癌发生的主要分子途径之一^[7]。近年来的研究表明, MMR蛋白的表达并非简单的

“全”或“无”模式, 出现非经典表达模式的患者可能是一类特殊的子集, 存在不同于经典MMR蛋白缺失患者的临床病理特征与分子改变^[8-9], 而关于不同MMR状态下结直肠癌患者的KNB突变谱特征尚无深入研究。本研究将dMMR结直肠癌患者分为经典dMMR和非经典dMMR组, 回顾性分析477例dMMR结直肠癌患者的临床病理特征、MMR、MSI及与KNB之间的相关性, 为临床检测及治疗提供重要依据。

1 资料与方法

1.1 研究人群

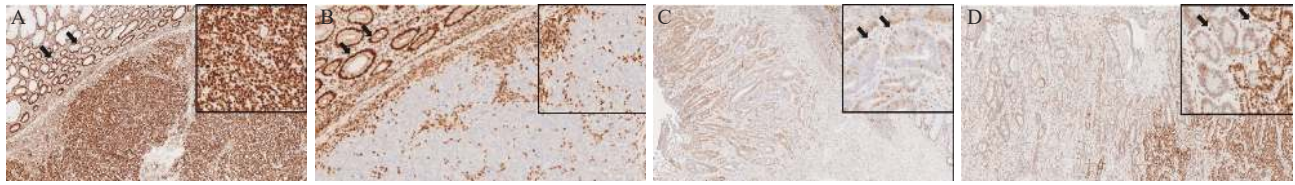
回顾性收集2016年1月至2023年10月在华中科技大学同济医学院附属肿瘤医院病理科确诊的477例结直肠癌患者的临床病理及分子检测 (MSI-PCR及NGS) 资料。复核MSH2、MSH6、MLH1、PMS2四种MMR蛋白在肿瘤细胞的表达, 对既往未行分子检测的部分患者进行PCR-MSI和NGS补充检测。本研究经华中科技大学同济医学院附属肿瘤医院伦理委员会批准, 全体受试者均签署了知情同意书, 批准文号: LLHBCH2023YN-059。

1.2 MMR蛋白的免疫组织化学检测及结果判读

纳入结直肠癌组织的FFPE样本, 采用En-Vision法, Dako Link48全自动免疫组织化学染色仪 (Dako公司, 美国) 行MMR蛋白IHC染色, 每张IHC切片以阑尾作为外对照, 即用型抗体MSH2 (鼠单抗FE11)、MSH6 (兔单抗EP49)、MLH1 (鼠单抗ES05) 及PMS2 (兔单抗EP51) 均购自Dako公司。IHC结果均由本院两位经培训后的病理医师采用双盲法阅片评估。

判读标准: 在内对照细胞 (正常肠道腺上皮及间质细胞等) 核着色良好的情况下, MMR蛋白完整表达: 大于90%的肿瘤细胞均一着色; MMR蛋白完全缺失: 大于90%的肿瘤细胞完全不着色; 除此之外的所有类型均定义为MMR蛋白异质性表达, 包括: (1) 不少于10%的肿瘤细胞MMR蛋白呈区域/斑驳缺失表达; (2) 不少于10%的肿瘤细胞MMR蛋白表达弱于对照, 见图1。

根据MMR蛋白的表达情况, 将477例患者分为 (1) pMMR组: 四种MMR蛋白均完整表达 (图1A); (2) 经典dMMR组: 仅一种MMR蛋白或伴侣蛋白共同表现为完全缺失, 或出现≥三种MMR蛋白表现为蛋白完全缺失 (图1B); (3) 非经典dMMR组: 至少一个MMR蛋白为完全缺失, 其他三个蛋白中至少一个MMR蛋白为异质性表达 (图1C、D)。



A: complete expression of MMR protein; B: complete loss of MMR protein; C, D: heterogeneous expression of MMR proteins. Positive-staining normal intestinal mucosal cells or stromal cells as positive internal control (arrows). Main image: $\times 40$. Sub-image: $\times 200$.

图1 结直肠癌组织中MMR蛋白表达情况

Figure 1 MMR protein expression patterns in colorectal cancer tissues

1.3 MSI PCR检测及结果判读

采用QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit试剂盒 (QIAGEN GmbH公司, 德国, 货号: 56404), 对同一个体的肿瘤及正常对照组织FFPE标本进行DNA提取, 采用分光光度计 (Merinton公司, 北京, 设备型号: SMA4000) 测DNA提取液的浓度和纯度。采用MSI检测试剂盒 (桐树生物科技有限公司, 常州, 货号: 310010) 行多重荧光PCR-毛细管电泳法检测MSI状态。应用3500 Dx基因分析仪 (Life Technologies公司, 美国, 设备型号: 3500 Dx) 进行毛细管电泳检测及数据分析。2个及以上位点不一致即判断为高度微卫星不稳定 (MSI-H), 1个位点不一致判断为低度微卫星不稳定 (MSI-L), 全部一致为微卫星稳定 (MSS)。MSI检测结果均由本院两位经培训后的病理医师进行评估。

1.4 MSI NGS检测及结果判读

提取中性福尔马林固定、石蜡包埋的切片或切卷FFPE肿瘤样本中基因组DNA, 同时将最后一张切片进行HE染色, 用于评估肿瘤细胞占比 (肿瘤细胞数占整张切片细胞数的比例需 $>20\%$), 对6~10个连续5 μm 切片的组织进行手动显微切割, 富集目标肿瘤区域。采用基于Illumina测序平台的NGS技术进行46基因检测, 包括与Lynch综合征有关的DNA错配修复基因MLH1、PMS2、MSH2和MSH6, 以及结直肠癌中会发生突变的KRAS、NRAS、BRAF、PIK3CA、APC和TP53基因等。检测试剂盒为人多基因突变检测试剂盒 (凯康) (燃石医学, 广州, 货号: RS032-12)。所有进行NGS检测的样本的核酸质量评估及NGS的质量控制均合格。

1.5 统计学方法

所有数据采用SPSS25.0软件进行统计学分析, 相关性分析采用卡方或费希尔精确检验, 检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床病理特征

477例结直肠癌患者中, pMMR组341例 (71.5%)、经典dMMR组97例 (20.3%)、非经典dMMR组39例 (8.2%)。与pMMR组相比, 经典dMMR组 ≤ 50 岁人群占比更多 (38.1% vs. 18.5%, $P<0.001$), 女性患者更常见 (49.5% vs. 37.0%, $P=0.034$), 发病部位更多出现在右半结肠 (54.6% vs. 20.8%, $P<0.001$), 更多出现黏液分泌 (15.5% vs. 7.0%, $P<0.001$), 分化较差 (42.3% vs. 27.3%, $P=0.006$), 但较少出现淋巴结转移 (24.7% vs. 44.9%, $P<0.001$) 及远处转移 (2.1% vs. 8.8%, $P=0.025$)。与pMMR组相比, 非经典dMMR组的发病部位更容易出现在右半结肠 (64.1% vs. 20.8%, $P<0.001$), 组织学类型更多出现除腺癌和黏液腺癌之外的其他类型 (20.5% vs. 5.3%, $P=0.003$), 但较少出现淋巴结转移 (17.9% vs. 44.9%, $P=0.002$), 见表1。

2.2 MMR IHC与MSI PCR的一致性分析

pMMR组患者四种MMR蛋白均为完整表达, 经典dMMR组患者按照MMR蛋白完全缺失发生频率由高至低依次为: MLH1-PMS2 (60.8%, 59/97)、MSH2-MSH6 (22.7%, 22/97)、MSH6 (6.2%, 6/97)、PMS2 (6.2%, 6/97)、MSH6-MLH1-PMS2 (3.1%, 3/97) 和MSH2-MSH6-MLH1 (1.0%, 1/97); 非经典dMMR组患者按照MMR蛋白完全缺失发生频率由高至低则为: MLH1-PMS2 (51.3%, 20/39)、MSH2-MSH6 (12.8%, 5/39)、MSH2 (12.8%, 5/39)、PMS2 (12.8%, 5/39) 和MSH6 (10.3%, 4/39)。

pMMR组中共73例患者有MSI检测结果, 均为MSS, IHC与PCR结果一致性为100.0%; dMMR组共114例患者有MSI检测结果, 其中113例 (99.1%) 为MSI-H, 1例 (MSH6单独缺失) 为MSI-L (0.9%), IHC与PCR结果一致性为99.1%, 两组IHC与PCR结果一致性高。

2.3 KNB突变谱分析

2.3.1 不同MMR组的KNB突变率 pMMR组中84例患者有KNB检测结果。经典dMMR组及非经典

dMMR组分别有43例及19例患者有KNB检测结果，与pMMR组比，非经典dMMR组的BRAF突变更常见，且差异有统计学意义（31.6% vs. 8.3%， $P=0.014$ ），见表2。

2.3.2 KRAS和BRAF突变患者的临床病理特征
pMMR组、经典dMMR组和非经典dMMR组分别有44例、24例和8例患者携带KRAS突变。与pMMR组比，经典dMMR组中携带KRAS突变的患者年龄更小（58.3% vs. 20.5%， $P=0.003$ ）、男性更多（75.0% vs. 50.0%， $P=0.070$ ）、更易出现特殊组织学类型（29.1% vs. 4.6%， $P=0.010$ ），但较少出现远处转

移（0 vs.22.7%， $P=0.011$ ）。与pMMR组比，携带KRAS突变的非经典dMMR患者较少出现淋巴结转移（0 vs. 54.5%， $P=0.005$ ），见表3。

pMMR组、经典dMMR组和非经典dMMR组分别有7例、5例和6例患者出现BRAF突变。与pMMR组比，经典dMMR组中出现BRAF突变的患者较少出现淋巴结转移（20.0% vs. 100%， $P=0.045$ ）和远处转移（0 vs.71.4%， $P=0.028$ ）。BRAF突变的非经典dMMR患者同样较少出现淋巴结转移（16.7% vs. 100%， $P=0.005$ ）和远处转移（0 vs.71.4%， $P=0.021$ ），见表3。

表 1 pMMR组和经典/非经典dMMR组患者的临床病理特征
Table 1 Clinicopathologic characteristics of patients in the pMMR and classical/nonclassical dMMR groups

Clinicopathologic characteristics	pMMR group <i>n</i> =341(%)	Classical dMMR group <i>n</i> =97(%)	<i>P</i> *	Nonclassical dMMR group <i>n</i> =39(%)	<i>P</i> #
Age (years)					
≤50	63(18.5)	37(38.1)	<0.001	12(30.8)	0.087
>50	278(81.5)	60(61.9)		27(69.2)	
Gender					
Male	215(63.0)	49(50.5)	0.034	21(53.8)	0.297
Female	126(37.0)	48(49.5)		18(46.2)	
Tumor site					
Right colon	71(20.8)	53(54.6)	<0.001	25(64.1)	<0.001
Left colon	93(27.3)	29(29.9)		9(23.1)	
Rectum	177(51.9)	15(15.5)		5(12.8)	
Histo-type					
Adenocarcinoma	299(87.7)	70(72.1)	0.001	28(71.8)	0.003
Mucous adenocarcinoma	24(7.0)	15(15.5)		3(7.7)	
Others	18(5.3)	12(12.4)		8(20.5)	
Histo-grade					
G1–G2	248(72.7)	56(57.7)	0.006	28(71.8)	>0.999
G3	93(27.3)	41(42.3)		11(28.2)	
Lymph node metastasis					
No	188(55.1)	73(75.3)	<0.001	32(82.1)	0.002
Yes	153(44.9)	24(24.7)		7(17.9)	
Metastasis					
No	311(91.2)	95(97.9)	0.025	39(100.0)	0.058
Yes	30(8.8)	2(2.1)		0(0.0)	

Notes: *: pMMR group vs. classical dMMR group; #: pMMR group vs. nonclassical dMMR group.

表 2 pMMR组和经典/非经典dMMR组结直肠癌患者KNB突变比较
Table 2 Comparison of KNB mutations among colorectal cancer patients in the pMMR and classical/nonclassical dMMR groups

KNB	pMMR group <i>n</i> =84(%)	Classical dMMR group <i>n</i> =43(%)	<i>P</i> *	Nonclassical dMMR group <i>n</i> =19(%)	<i>P</i> #
KRAS					
Wild type	40(47.6)	19(44.2)	0.851	11(57.9)	0.456
Mutant type	44(52.4)	24(55.8)		8(42.1)	
NRAS					
Wild type	78(92.9)	42(97.7)	0.422	19(100.0)	0.590
Mutant type	6(7.1)	1(2.3)		0(0.0)	
BRAF					
Wild type	77(91.7)	39(90.7)	>0.999	13(68.4)	0.014
Mutant type	7(8.3)	4(9.3)		6(31.6)	

Notes: *: pMMR group vs. classical dMMR group; #: pMMR group vs. nonclassical dMMR group.

表 3 pMMR组和经典/非经典dMMR组KRAS/BRAF突变患者的临床病理特征(*n* (%))

Table 3 Clinicopathologic characteristics of patients with KRAS/BRAF mutations in the pMMR and classical/nonclassical dMMR groups (*n* (%))

Clinicopathologic characteristics	KRAS mutation					BRAF mutation				
	pMMR group	Classical dMMR group	<i>P</i> [*]	Non-classical dMMR group	<i>P</i> [#]	pMMR group	Classical dMMR group	<i>P</i> [*]	Non-classical dMMR group	<i>P</i> [#]
Age (years)										
≤50	9(20.5)	14(58.3)	0.003	0(0.0)	0.323	4(57.1)	0(0.0)	0.081	0(0.0)	0.070
>50	35(79.5)	10(41.7)		8(100.0)		3(42.9)	5(100.0)		6(100.0)	
Gender										
Male	22(50.0)	18(75.0)	0.070	5(62.5)	0.705	3(42.9)	2(40.0)	1.000	1(16.7)	0.559
Female	22(50.0)	6(25.0)		3(37.5)		4(57.1)	3(60.0)		5(83.3)	
Tumor site										
Right colon	20(45.5)	15(62.5)	0.390	5(62.5)	0.598	3(42.9)	5(100.0)	0.116	5(83.3)	0.396
Left colon	9(20.5)	4(16.7)		2(25.0)		3(42.9)	0(0.0)		1(16.7)	
Rectum	15(34.0)	5(20.8)		1(12.5)		1(14.2)	0(0.0)		0(0.0)	
Histo-type										
Adenocarcinoma	35(79.5)	16(66.7)	0.010	6(75.0)	0.126	5(71.4)	2(40.0)	0.222	4(66.7)	1.000
Mucous adenocarcinoma	7(15.9)	1(4.2)		0(0.0)		1(14.3)	0(0.0)		0(0.0)	
Others	2(4.6)	7(29.1)		2(25.0)		1(14.3)	3(60.0)		2(33.3)	
Histo-grade										
G1–G2	32(72.7)	16(66.7)	0.781	6(75.0)	>0.999	0(0.0)	1(20.0)	0.417	2(33.3)	0.192
G3	12(27.3)	8(33.3)		2(25.0)		7(100.0)	4(80.0)		4(66.7)	
Lymph node metastasis										
No	20(45.5)	17(70.9)	0.074	8(100.0)	0.005	0(0.0)	3(60.0)	0.045	5(83.3)	0.005
Yes	24(54.5)	7(29.1)		0(0.0)		7(100.0)	2(20.0)		1(16.7)	
Metastasis										
No	34(77.3)	24(100.0)	0.011	8(100.0)	0.328	2(28.6)	5(100.0)	0.028	6(100.0)	0.021
Yes	10(22.7)	0(0.0)		0(0.0)		5(71.4)	0(0.0)		0(0.0)	

Notes: *: pMMR group vs. classical dMMR group; #: pMMR group vs. nonclassical dMMR group.

此外，pMMR组和经典dMMR组分别有6例和1例具有NRAS突变，非经典dMMR组无NRAS突变患者，因可供分析的样本量少，未进行统计学分析。

2.3.3 KNB不同突变位点的比较 pMMR组中44例患者有KRAS突变，6例有NRAS突变，7例有BRAF突变。经典dMMR组中24例患者有KRAS突变，1例有NRAS突变，5例有BRAF突变。非经典dMMR组中8例患者有KRAS突变，无NRAS突变患者，6例有BRAF突变。与pMMR组比，经典/非经典dMMR组KRAS G13密码子突变均更常见，差异有统计学意义（45.8% vs. 13.6%，*P*=0.005和62.5% vs. 13.6%，*P*=0.016），见表4。

2.3.4 MMR与KNB基因致病性/可能致病性突变的差异性分析 经典dMMR组MSH2和MLH1基因致病性/可能致病性突变率（包含体系及胚系突变）高于pMMR组（突变率均为20.0% vs. 0，均*P*<0.05）。非经典dMMR组MSH2（18.8% vs. 0）、MSH6（37.5% vs. 0）和MLH1（31.3% vs. 0）基因致病性/可能致病性突变率高于pMMR组（均*P*<0.05），且6例MSH6基因突变的患者均为MLH1-PMS2共同完全缺失合并MSH6非经典表达模式；而KRAS致病性/可能致病性体细胞突变低于pMMR组（6.2% vs. 70.6%，*P*=0.016）。PMS2、NRAS和BRAF基因组间均无明显统计学差异，见表5。

表 4 pMMR和经典/非经典dMMR组KNB不同突变位点的比较(*n* (%))

Table 4 Comparison of different mutation sites of KNB in the pMMR and classical/nonclassical dMMR groups (*n* (%))

KNB sites	pMMR group	Classical dMMR group	<i>P</i> [*]	Nonclassical dMMR group	<i>P</i> [#]
KRAS G12	30(68.2)	9(37.5)	0.005	3(37.5)	0.016
KRAS G13	6(13.6)	11(45.8)		5(62.5)	
Others	8(18.2)	4(16.7)		0(0.0)	
NRAS G12	4(66.7)	0(0.0)	0.429	0(0.0)	/
Others	2(33.3)	1(100.0)		0(0.0)	
BRAF V600E	7(100.0)	3(60.0)	0.152	5(83.3)	0.462
Others	0(0.0)	2(40.0)		1(16.7)	

Notes: *: pMMR group vs. classical dMMR group; #: pMMR group vs. nonclassical dMMR group. /: Not applicable.

表 5 pMMR和经典/非经典dMMR组MMR与KNB基因突变的频次比较(*n* (%))

Table 5 Comparison of MMR and KNB gene mutations frequency in the pMMR and classical/nonclassical dMMR groups (*n* (%))

Genes	pMMR group	Classical dMMR group	<i>P</i> [*]	Nonclassical dMMR group	<i>P</i> [#]
MSH2	0(0.0)	3(20.0)	0.013	3(18.8)	0.045
MSH6	0(0.0)	2(13.3)	0.061	6(37.5)	0.002
MLH1	0(0.0)	3(20.0)	0.013	5(31.3)	0.005
PMS2	0(0.0)	2(13.3)	0.061	1(6.2)	0.370
KRAS	12(70.6)	3(20.0)	0.711	1(6.2)	0.016
NRAS	2(11.8)	0(0.0)	1.000	0(0.0)	0.524
BRAF	3(17.6)	2(13.3)	0.587	0(0.0)	0.286

Notes: *: pMMR group vs. classical dMMR group; #: pMMR group vs. nonclassical dMMR group.

2.4 5例髓样癌/合并髓样癌形态患者的临床病理特征及分子特征

在dMMR组中，共有5例组织学类型为髓样癌或合并髓样癌形态的病例，均存在MLH1和PMS2的缺失。其中1例MSH2和MSH6完整表达，3例MSH6区域缺失同时MSH2相应区域表达弱于对照；1例MLH1和PMS2在不同组织学类型表达模式不同（腺癌中完整表达，髓样癌中完全缺失）。这5例患者均为MSI-H。有3例进行了NGS检测，2例存在MSH6致病性体系变异（均为c.3261位点）。1例存在BRAF致病性体系突变。5例均有KNB结

果，3例有BRAF突变，见表6。

3 讨论

MMR/MSI是判断结直肠癌患者治疗疗效及预后的良好生物标志物。KRAS是结直肠癌中常见的基因突变，KRAS野生型的患者能在抗EGFR治疗中获益。NRAS基因突变在结直肠癌中的发生率较低，但同样影响患者对某些靶向治疗的反应。BRAF突变在结直肠癌中较为罕见，但它通常与较差的预后相关。因此，明确MMR/MSI及KRAS/NRAS/BRAF状态对结直肠癌患者的治疗及预后至关重要。

dMMR结直肠癌患者发病年龄较小、好发于右半结肠、病理类型以黏液腺癌为主，而且分化较差^[10-11]。本研究发现，经典dMMR组和非经典dMMR组患者存在与既往研究相似的临床病理特征，且经典dMMR组女性患者较多，非经典dMMR组患者易见特殊组织学类型（如印戒细胞癌，混合组织学类型等），提示非经典dMMR结直肠癌患者同样具有提示较差预后的病理学特征。

既往研究表明，MMR蛋白最常见的缺失类型是MLH1-PMS2的共缺失^[10,12]，与本研究结果一致。本研究还观察到4例患者存在三种蛋白同时性完全缺失。MLH1、PMS2和MSH6同时表达缺失可能是两个MMR子系统均受累的dMMR病例的普遍表达模式，且与DNA修复系统广泛失调相关^[8]。同

表 6 5例髓样癌/合并髓样癌形态患者的临床病理及分子特征

Table 6 Clinicopathologic and molecular characteristics of five patients with medullary carcinoma or medullary carcinoma components

Gender	Age (year)	Histo-type	MSH2	MSH6	MLH1	PMS2	PCR	NGS		KNB
								MSI	Variation	
Male	49	MC	A	A	B	B	MSI-H		ND	wt
Male	65	80%AC+ 20%MC	C (weaker)	C	B	B	MSI-H		ND	wt
Female	70	70%AC+ 30%MC	C (weaker)	C(AC partial loss)	B	B	MSI-H	MSI-H	MSH6:c.3261dup (p.Phe1088fs) AF=16.57%; I MSH6:c.3775_3776del (p.Asn1259fs) AF=17.90%; III	BRAF mut
Female	79	90%MC+ 10%MAC	C (weaker)	C(MC partial loss)	B	B	MSI-H	MSI-H	MSH6:c.3261dup (p.Phe1088fs) AF=13.48%; I	BRAF mut
Female	84	95%MC+ 5%AC	A	A	MC-AC+	MC-AC+	MSI-H	MSI-H	BRAF:c.1799T>A (p.Val600Glu) AF=17.54%; I	BRAF mut

Notes: AC: adenocarcinoma; MAC: mucinous adenocarcinoma; MC: medullary carcinoma; A: the MMR protein was completely expressed; B: the MMR protein underwent complete loss; C: the MMR protein underwent partial region loss or became patchy; D: the expression of the MMR protein was weaker than that of the control; AF: allele fraction; I: variants of clinical significance; III: variants of unclear clinical significance; wt: wild type; mut: mutation type; ND: not done.

时, MMR蛋白的表达有一定的异质性, 有时可出现区域缺失、斑驳状或弱于肿瘤周边正常阳性对照的模式, 可能具有特殊的分子机制^[9,13]。本研究结果显示, 非经典MMR模式更多出现在MLH1-PMS2完全缺失组合中, 有研究发现MLH1和PMS2共同缺失的结直肠癌可能会同时合并其他MMR蛋白的完全缺失/部分缺失(非经典模式), MSH6基因编码区微卫星序列的体细胞突变是其潜在机制^[8,14]。研究表明, dMMR和MSI之间的一致性较高^[15-16], 与本研究一致(99.1%)。1例不一致病例为MSH6单独缺失, MSH6表达缺失通常不会导致异源二聚体的主要蛋白MSH2表达同时丧失, MSH6单独缺失可能是由MMR系统的其他组分如MSH3代替MSH6发挥作用造成的, 并未引起MSI-H的发生^[17]。

KRAS/NRAS/BRAF基因突变与结直肠癌的预后密切相关^[18-19]。本研究中不同MMR状态组别KRAS突变率均最高。当KRAS基因突变时, RAS-RAF-MAPK信号转导通路被激活, 导致抗EGFR治疗无效^[20]。既往研究中, NRAS基因突变率低于5%^[21-22], BRAF基因突变率为2%~15%^[23]。本研究pMMR组中NRAS突变率(7.1%)略高于既往报道, 非经典dMMR组BRAF突变率(31.6%)较高。非经典dMMR组中携带BRAF突变的6例患者均存在MLH1和PMS2的完全缺失合并MSH2/MSH6的异质性表达模式, 可能是由于MLH1基因启动子甲基化引起MLH1蛋白表达缺失, 而BRAF突变与MLH1蛋白缺失和甲基化状态有关。

本研究发现, KRAS突变的经典/非经典dMMR患者临床病理特征不同, 但与pMMR组相比, KRAS G13密码子突变均更常见, 且非经典dMMR组该位点突变频率更高。有研究表明, 结直肠癌KRAS基因G12和G13密码子突变频率不同, 且G13密码子突变在MSI遗传背景中占主导地位^[24]。本研究非经典dMMR组高频KRAS G13密码子突变说明了该集合分子特征的特殊性, 有待后续增加样本量进一步研究。

本研究经典dMMR组患者仅MSH2和MLH1基因突变率高于pMMR组, 而非经典dMMR组患者MSH6基因突变率也高于pMMR组, KRAS基因突变率均低于pMMR组。既往报道MSH6是最易出现非经典缺失的MMR蛋白类型^[16], MSH6的非经典缺失并不是由于MSH6胚系突变导致的, 可能继发于MLH1甲基化或其他基因的异常^[25]。本研究非经典dMMR组6例MSH6基因突变均为体系突变, 未发现胚系突变, 这6例患者均为MLH1-PMS2共缺失合

并MSH6非经典表达模式, 提示可能继发于MLH1甲基化。且同时在4例中观察到MSH6基因c.3261位点致病性突变。大多数结直肠癌是由KRAS基因被激活, 通过传统的腺瘤-癌途径引起, 本研究中非经典dMMR组中较低的KRAS基因突变率和较高的MSH6基因突变率, 说明该亚型患者具有不同于pMMR组和经典dMMR组的分子病理学特征——最常见的是MLH1-PMS2完全缺失合并MSH6非经典表达模式, 同时MSH6基因c.3261位点突变起主导作用。

Reitsam等研究了5例MLH1、PMS2和MSH6同时缺失结直肠癌患者的临床病理特征, 其中两例为髓样癌, 这两例均存在MSH6基因突变^[8], 本研究中5例髓样癌或合并髓样癌形态的患者有2例为MSH6基因突变, 无MLH1突变。有研究表明, MSH6基因编码区微卫星序列的体细胞突变是MLH1-PMS2同时缺失的结直肠癌中MSH6表达缺失的潜在机制^[15]。本研究一例患者MLH1和PMS2仅在髓样癌区域(占比95%)表达缺失, 腺癌部分完整表达, 该患者MSI-H的原因可能是由于MLH1启动子甲基化和BRAF基因具有明确致病性的体系突变共同引起。BRAF突变是锯齿状腺瘤-癌途径的一个特异性标志物, 该途径可能以MSI-H结直肠癌为终点^[26]。与结直肠腺癌相比, 髓样癌dMMR表型出现频率更高, BRAF突变率更高^[27]。该例肿瘤具有异质性, 髓样癌部分可能是由MLH1启动子甲基化和BRAF突变引起, 而腺癌部分为传统的腺瘤-癌途径。

综上所述, 经典/非经典dMMR组结直肠癌患者具有不同于pMMR组的临床病理特征, MMR IHC检测可很好预测MSI状态。KRAS突变的经典/非经典dMMR结直肠癌患者之间临床病理学特征不同, 但均更常见G13位点突变。非经典dMMR组常见MLH1-PMS2完全缺失合并MSH6非经典表达模式。MSH6基因突变可在部分含髓样癌成分的癌中起关键作用。病理医师需关注MMR蛋白的非经典表达模式及与KNB突变谱之间的相关性, 以更好地指导临床治疗和患者全程管理。

利益冲突声明:

所有作者均声明不存在利益冲突。

参考文献:

- [1] Cervantes A, Martinelli E. Updated treatment recommendation for third-line treatment in advanced colorectal cancer from the ESMO Metastatic Colorectal Cancer Living Guideline[J]. *Ann Oncol*, 2024, 35(2): 241-243.
- [2] Cervantes A, Adam R, Roselló S, et al. Metastatic colorectal

- cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up[J]. *Ann Oncol*, 2023, 34(1): 10-32.
- [3] Benson AB, Venook AP, Al-Hawary MM, *et al.* Colon Cancer, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology[J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2021, 19(3): 329-359.
- [4] Sinicrope FA, Sargent DJ. Molecular pathways: microsatellite instability in colorectal cancer: prognostic, predictive, and therapeutic implications[J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18(6): 1506-1512.
- [5] Guillotin D, Martin SA. Exploiting DNA mismatch repair deficiency as a therapeutic strategy[J]. *Exp Cell Res*, 2014, 329(1): 110-115.
- [6] Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer [J]. *Gastroenterology*, 2010, 138(6): 2073-2087. e3.
- [7] Oneda E, Zaniboni A. Adjuvant treatment of colon cancer with microsatellite instability - the state of the art[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2022, 169: 103537.
- [8] Reitsam NG, Maerkl B, Dintner S, *et al.* Concurrent loss of MLH1, PMS2 and MSH6 immunorexpression in digestive system cancers indicating a widespread dysregulation in DNA repair processes[J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 1019798.
- [9] Zito Marino F, Amato M, Ronchi A, *et al.* Microsatellite Status Detection in Gastrointestinal Cancers: PCR/NGS Is Mandatory in Negative/Patchy MMR Immunohistochemistry[J]. *Cancers(Basel)*, 2022, 14(9): 2204.
- [10] Chen L, Chen G, Zheng X, *et al.* Expression status of four mismatch repair proteins in patients with colorectal cancer: clinical significance in 1238 cases[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2019, 12(10): 3685-3699.
- [11] Salem ME, Battaglin F, Goldberg RM, *et al.* Molecular Analyses of Left- and Right-Sided Tumors in Adolescents and Young Adults with Colorectal Cancer[J]. *Oncologist*, 2020, 25(5): 404-413.
- [12] Hissong E, Crowe EP, Yantiss RK, *et al.* Assessing colorectal cancer mismatch repair status in the modern era: a survey of current practices and re-evaluation of the role of microsatellite instability testing[J]. *Mod Pathol*, 2018, 31(11): 1756-1766.
- [13] Li X, Zhang S, Zeng J, *et al.* Heterogeneous expression of mismatch repair proteins and interpretation of immunohistochemical results in colorectal cancer and endometrial cancer[J]. *Pathol Res Pract*, 2023, 248: 154647.
- [14] Shia J, Zhang L, Shike M, *et al.* Secondary mutation in a coding mononucleotide tract in MSH6 causes loss of immunorexpression of MSH6 in colorectal carcinomas with MLH1/PMS2 deficiency[J]. *Mod Pathol*, 2013, 26(1): 131-138.
- [15] 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.
- [16] Guyot D'asnières De Salins A, Tachon G, Cohen R, *et al.* Discordance between immunochemistry of mismatch repair proteins and molecular testing of microsatellite instability in colorectal cancer[J]. *ESMO Open*, 2021, 6(3): 100120.
- [17] Taieb J, Svrcek M, Cohen R, *et al.* Deficient mismatch repair/microsatellite unstable colorectal cancer: Diagnosis, prognosis and treatment[J]. *Eur J Cancer*, 2022, 175: 136-157.
- [18] Meng M, Zhong K, Jiang T, *et al.* The current understanding on the impact of KRAS on colorectal cancer[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 140: 111717.
- [19] Zhou Y, Kuang Y, Wang C, *et al.* Impact of KRAS mutation on the tumor microenvironment in colorectal cancer[J]. *Int J Biol Sci*, 2024, 20(5): 1947-1964.
- [20] Punt CJ, Koopman M, Vermeulen L. From tumour heterogeneity to advances in precision treatment of colorectal cancer[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(4): 235-246.
- [21] Palomba G, Doneddu V, Cossu A, *et al.* Prognostic impact of KRAS, NRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal carcinomas: a population-based study[J]. *J Transl Med*, 2016, 14(1): 292.
- [22] Wang Y, Liu H, Hou Y, *et al.* Performance validation of an amplicon-based targeted next-generation sequencing assay and mutation profiling of 648 Chinese colorectal cancer patients[J]. *Virchows Arch*, 2018, 472(6): 959-968.
- [23] Taieb J, Le Malicot K, Shi Q, *et al.* Prognostic Value of BRAF and KRAS Mutations in MSI and MSS Stage III Colon Cancer[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2017, 109(5): djw272.
- [24] Oliveira C, Westra JL, Arango D, *et al.* Distinct patterns of KRAS mutations in colorectal carcinomas according to germline mismatch repair defects and hMLH1 methylation status[J]. *Hum Mol Genet*, 2004, 13(19): 2303-2311.
- [25] 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.
- [26] 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.
- [27] O'Brien MJ, Yang S, Mack C, *et al.* Comparison of microsatellite instability, CpG island methylation phenotype, BRAF and KRAS status in serrated polyps and traditional adenomas indicates separate pathways to distinct colorectal carcinoma end points[J]. *Am J Surg Pathol*, 2006, 30(12): 1491-1501.

[编辑: 刘红武; 校对: 邱颖慧]

作者贡献:

余金川: 数据收集及分析、论文撰写

肖雪雪、何伟莹、杨亚楠: 数据收集及分析

岳君秋: 论文撰写指导、审阅及修改