

林奇综合征相关大肠癌筛查方法的比较及应用*

邹灿灿, 唐 怡, 李庆姝, 肖 明, 黎 明, 杨 炼, 李 娟, 王娅兰
(重庆医科大学附属第一医院 病理科, 重庆 400016)

摘要:【目的】比较目前林奇综合征相关大肠癌的筛查方法的优点和局限性,以便更好地应用。【方法】通过综述的方法对林奇综合征相关大肠癌的筛查方法进行比较和总结。【结果】免疫组化检测方法的优点为技术相对简单及便宜、适用于任何组织并可对微卫星不稳定性检测失败的病例进行检测;局限是结果可能受各种生物和技术因素的影响、染色存在一定异质性给医师带来解读困难、可能出现假阳性结果。微卫星检测方法的优点是结果更容易解读且更易重复;缺点是被检组织不具普适性、分析需正常组织作对比、可能存在假阴性或假阳性结果。DNA测序是林奇综合征唯一的确诊方法,但费用昂贵且耗时较长。【结论】几种筛查方法各有优缺点且相互补充,正确理解有利于正确选择从而提高林奇综合征的筛出率。

关键词:林奇综合征相关大肠癌;临床病理特征;筛查方法比较

中图分类号:R735.3+4

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2019)03-0124-05

大肠癌是涉及遗传和环境因素的多因素疾病。据估计,20%~30%的大肠癌是家族性或遗传性的,约10%的大肠癌与孟德尔遗传模式一致,如家族性腺瘤性息肉病(FAP)和林奇综合征^[1]。林奇综合征(Lynch syndrome, LS)是一种癌症易感综合征,是因DNA错配修复(DNA mismatch repair, MMR)基因的种系突变所致的常染色体显性遗传病^[2]。LS最早于1895年,被美国病理学家Warthin发现并在1913年发文报道为“癌易感家族”^[3],林奇综合征相关大肠癌2010年前称为“遗传性非息肉性结直肠癌(Hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC)”,随着对发病机制的进一步研究,2010年在《消化系统肿瘤WHO分类(第四版)》一书中被正式定义为林奇综合征。作为一个重要临床亚型,LS约占全部大肠癌的2%~5%,即每35名大肠癌患者中就有1名是林奇综合征患者,每名患者至少有3名林奇综合征的亲属,使之成为最常见的大肠癌遗传形式。

林奇综合征相关大肠癌与散发性大肠癌(即非遗传性大肠癌)无论是分子机制、预后还是临床管理都存在不同,因此对大肠癌患者是否为林奇综合征的筛查至关重要。本综述主要总结了目前临床对林奇综合征相关大肠癌的认识及筛查方法,并比较了这几种筛查方法的优点和局限性。

1 林奇综合征相关大肠癌临床病理特征

林奇综合征是由于错配修复基因(MLH1, PMS2, MSH2 和 MSH6)或EPCAM基因(约2%~3%的林奇综合征)的种系突变导致错配修复蛋白失活。在DNA复制过程中失活的错配修复蛋白失去了对DNA的插入或缺失错误的识别和修复功能,这些不同的基因组复制错误(包括癌基因激活或肿瘤抑制基因失活)得不到及时“纠正”而不断地积累,并传给子细胞,最终可导致子细胞各种癌症的发生和发展。因此林奇综合征患者具有恶性肿瘤的高发病率。

相较于散发性大肠癌,林奇综合征相关大肠癌患者最大的临床不同点就在于,后者具有家族遗传性,通常是多系统的发病,发生的恶性肿瘤并不仅限于结肠、直肠,还包括子宫内膜癌、胃癌、卵巢癌、尿路上皮癌等,54%~61%的患者会发生第二种原发肿瘤,15%~23%甚至会发生3种及以上的原发肿瘤。但LS患者发生大肠癌的风险最高。2009年的一项评估报告称,LS男性患者终生大肠癌风险为66%,女性为43%^[4]。除大肠癌以外,中国、日本以及韩国等国家的肠外癌患者以患胃癌为主,但在女性林奇综合征患者中,子宫内膜癌是最常见的肠道

* 收稿日期:2019-02-13 修回日期:2019-05-08 网络出版时间:2019-05-09 19:30

第一作者简介:邹灿灿,女,研究方向为肿瘤病理,E-mail:1149914815@qq.com;通信作者:王娅兰,女,教授,博士生导师,E-mail:wangyalan@cqmu.edu.cn

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20190509.1930.046.html>

外肿瘤^[5]。其次林奇综合征相关大肠癌发病年龄较散发性大肠癌小,平均为 45 岁且大多好发于右半结肠。尽管这类大肠癌患者具有多发性(同时或异时),但是它的 5 年生存率却明显高于散发性大肠癌。

相较于散发性大肠癌林奇综合征相关大肠癌患者的组织病理学表现也有一些特点。后者常常伴有克罗恩样淋巴细胞反应以及肿瘤上皮内较多淋巴细胞浸润,有研究者认为后者可能与预后相关;同时比散发性大肠癌更常出现黏液腺癌/印戒细胞癌分化或髓样癌的生长模式。由于 DNA 复制错误的积累,林奇综合征患者中一个小结肠腺瘤可能在 2~3 年的时间发展为结肠癌,而散发性结肠癌需要 6~10 年^[6]。

2 林奇综合征相关大肠癌临床筛查方法

在临床,有一套筛查林奇综合征的临床标准,包括:阿姆斯特丹标准 I(Amsterdam Criteria I, AC I)、阿姆斯特丹标准 II(AC II)、Bethesda 指南(Bethesda guidelines, BG)及其修订版(RBG)。1991 年,AC I 由 HNPCC 国际合作组织建立,认为符合以下标准的患者可被诊断为林奇综合征:1) 该家族中至少有 3 名患有大肠癌(不包括家族性腺瘤性息肉病);2) 家庭中至少连续两代患有大肠癌且至少 1 名患者是其他 2 名患者的一级亲属;3) 至少有一名患者在 50 岁之前发病。该标准于 1999 年进行了修订,即 AC II,修改为该家族中至少有 3 名成员患有林奇综合征相关恶性肿瘤(包括除大肠癌外的:子宫内膜癌、胃癌、小肠癌、肾盂癌等),其余标准保持不变。但是 AC 标准过于严格,特异性虽可高达 99%,但敏感性过低仅为 28%~45%^[7],导致许多林奇综合征患者被排除在外。

后来,提出了 Bethesda 指南(BG)及其修订版本(RBG)。BG 降低了筛选的严格性,比阿姆斯特丹标准更具包容性。RBG 认为,在以下情况中患者应进行进一步的微卫星序列测试:1) 在 50 岁以下的患者中诊断出来的大肠癌,或者存在同期大肠癌或其他 HNPCC 相关肿瘤的任何年龄患者。2) 年龄小于 60 岁且具有林奇综合征的组织学特征的患者。3) 至少 1 例在 50 岁之前诊断的一级亲属有林奇综合征相关癌症。4) 无论年龄大小,至少有 2 位一级或二级亲属患有林奇综合征相关癌症。这种临床纳入标准提高了筛查林奇综合征的敏感性(73%~91%),但却降低了特异性(77%~82%)^[7],这样就包括一些散发性大肠癌在其中,让他们的亲属陷入“会得癌症”的担忧中。在 2008 年,Hampel 等人研究了一个队列,包括来自未经选择的 500 个大肠癌患者,结果显示大约 28%的林奇综合征(通过种系测序证明)不能满足 RBG^[4]。

总的来说,严格的 AC 标准具有太低的敏感性而不适合,虽然 Bethesda 指南的敏感性增强了,但特异性又降低了,减少了林奇综合征的检出率。因此,需要进行相关的实验室检查方法以提高检出率。目前 NCCN 机构提出要对所有新诊断的大肠癌和子宫内膜癌患者,无论有无家族史,均进行相应的实验室检查(免疫组化或微卫星不稳定检测),以明确哪些患者需要进一步进行基因检测^[8]。

3 林奇综合征相关的大肠癌实验室筛查方法

目前,临床上采用的林奇综合征相关大肠癌实验室检测方法有 3 种,可分为两类:筛查方法和确诊方法。前者主要包括免疫组织化学(Immunohistochemistry, IHC)和微卫星不稳定性(Microsatellite instability, MSI)检测,后者是针对患者 DNA 错配修复基因的分子测序,也是林奇综合征的最终的确证检测方法^[9]。

3.1 免疫组化(IHC)方法

林奇综合征相关大肠癌组织与正常黏膜相比,癌细胞中由于一种或多种错配修复基因的突变,使相应的错配修复基因产物蛋白失活,失活的蛋白不能与免疫抗体发生反应,在癌细胞中显示为阴性,从而被检测出来。目前,临床上通常使用包含 4 种最常受影响的错配修复蛋白(MLH1, MSH2, MSH6 和 PMS2)作为筛选的抗体组。

实际上早在 1996 年,针对 MMR 蛋白的单克隆抗体就开始用于筛选种系突变,但初期仅使用 MLH1 和 MSH2 作为筛查抗体组,使得 IHC 筛出率远远低于 MSI 检测。随着研究进一步深入,将 PMS2 和 MSH6 添加到抗体组中提高了 IHC 的灵敏度,从而产生了与 MSI 测试几乎相同的预测值^[10]。

3.2 微卫星不稳定性(MSI)的检测方法

“微卫星”是 DNA 中的短串联重复序列(大多只有二个核苷酸长度)。微卫星不稳定是由于 DNA 错配修复系统未能在 DNA 复制过程中纠正重复错误的插入或缺失,而导致微卫星等位基因长度的变化。因此,MSI 可被视为错配修复基因功能缺失的一种反映。MSI 检测的原理是在正常黏膜和癌组织 DNA 中提取一个或多个特定的微卫星重复序列,PCR 扩增后,可通过比较两者的核苷酸重复序列的长度而进行结果判读。1997 年,Bethesda

指南提出了一组 5 个微卫星标记,这些标记被引用作为 Bethesda 组,包括两个单核苷酸重复(BAT-25 和 BAT-26)和 3 个二核苷酸重复(D5S346, D2S123 和 D17S250)。根据 MSI 检测结果,医师可以确定 3 种微卫星表型:1) 微卫星高度不稳定(MSI-H),当大于 30%的标记显示不稳定时;2) 微卫星低度不稳定性(MSI-L),当低于 30%的微卫星标记不稳定时;3) 当没有标记显示不稳定时,判读为微卫星稳定(MSS)。只有检测出 MSI-H 的表型才具有临床意义。

3.3 DNA 测序方法

DNA 测序是直接检测错配修复基因突变的唯一技术,也是林奇综合征的最终确诊方法。林奇综合征最常见的突变方式是错义突变及缺失突变,直接导致了错配修复蛋白的失活或缺失。

4 林奇综合征相关的大肠癌实验室筛查方法比较

上述 3 种方法各有优点和局限性,它们不仅不是对立的反而是相辅相成的。了解并掌握好各自的优缺点,有利于正确解读、合理应用这些检测方法。

4.1 免疫组化(IHC)检测方法的优缺点及局限性

关于免疫组化筛选林奇综合征,具有的突出优点为:1) 免疫组化技术相对简单,大多数基层医院都可以实施,而且费用相对便宜、省时。Mvundur 等人^[11]研究报道认为林奇综合征的各种筛查方法中,免疫组化作为基础筛查是最具成本效益。这是因为免疫组化检测后可以指导针对一个或两个错配修复基因进一步的种系基因检测,而不是全部 4 个^[12]。其次,研究表明对于林奇综合征的筛查,免疫组化几乎与微卫星不稳定性检测具有相同的敏感性^[13]。2) 免疫组化方法适用于任何类型的组织,包括冰冻组织或由甲醛/Boin 试剂固定的组织。3) 免疫组化方法也可以检测微卫星不稳定性检测失败的病例,尤其是 MSH6 突变的患者。由于 MSH6 突变的林奇综合征患者 MSI 表型通常是 MSI-L/MSS,MSI 检测可能会检测不出这些病例^[14]。

但是免疫组化仍然存在一些局限性:1) 免疫组化染色的结果可能受各种生物和技术因素的影响,例如抽样误差(特别是小活检组织)、组织的及时固定、克隆抗体的选择及染色程序的规范化等因素的影响^[15-16]。2) 据研究报道,免疫组化检测大肠癌错配修复蛋白表达具有一定异质性^[17],即同一癌组织中或同一癌腺体内免疫组化显色不均匀。免疫组化染色结果的可变性及异质性给病理医生对结果的解读带来了一定的困难,这可能造成同一病例不同医生却有不同解读,从而降低了免疫组化筛查林奇综合征的准确性。有研究表明虽然有经验的病理住院医师和病理学专家可以达到相同的解读水平,但总的来说病理观察者之间的解读差异还是相当大的,尤其是在“弱”染色上面难以达成共识^[18]。Overbeek 等人^[19]也指出免疫组化的解读需要经验,可能只在特定的环境中才可靠,针对免疫组化异质性的问题,尚需积累病例,进一步分析。3) 免疫组化检测的另一局限性在于,有一些错配修复基因的错义突变中,产生的错配修复蛋白虽然失去了蛋白的功能但仍然保持着蛋白的部分抗原性,这就使得检测中出现“假阳性”的结果。例如,在一项数列研究中,约 1/6 的 hMLH1 突变患者中免疫组化均未显示 MLH1 的丢失,但是 MSI 检测为阳性且基因检测显示该患者在 13 外显子中存在错义突变^[20]。

4.2 微卫星不稳定性(MSI)分析方法的优点及局限性

据研究显示,大约 85%~92%的林奇综合征具有 MSI-H 的表型,所以微卫星不稳定性分析可作为林奇综合征的筛选,并且可以作为免疫组化筛选的补充。微卫星不稳定性分析可以检测免疫组化检测失败的病例(尤其是 MLH1 错义突变的病例)。相较于免疫组化,微卫星不稳定性分析的结果更容易解读,不会因为不同医师而出现解读误差;另外后者的质量控制临床实验室中较易完成且分析结果容易重复^[21]。

MSI 检测的局限性:1) 并不是所有的组织都适用于 MSI 检测中采用的聚合酶链反应(PCR)技术,如 Boin 液体固定组织可以阻止聚合酶链反应而导致结果不准确。2) MSI 分析通常需要正常组织(优选正常肠黏膜)进行对比,给临床医生增加了一定负担。3) MSI 分析无法检出由 MSH6 突变引起的林奇综合征,常出现 MSS/MSI-L 的假阴性结果。4) MSI-H 表型也存在于约 12%的散发性大肠癌中,它们是因 MLH1 启动子的高甲基化所致并非错配修复基因的种系突变,导致筛查过程中假阳性结果^[21]。

4.3 DNA 测序的优点及局限性

DNA 测序是唯一可以直接检测错配修复基因突变存在和性质的方法,也是林奇综合征的确诊方法。但是 DNA 测序最大的局限性是费用相对昂贵,耗时太长。此外,另有研究表明,常用的 DNA 测序不能检测 MLH1 或 MSH2 中的所有致病突变^[22]。有些隐含的致病突变可能存在于未分析的序列中(如启动子区或深部内含

子区)^[23]。

5 总结

大肠癌是一种常见的恶性肿瘤,林奇综合征相关大肠癌较散发性大肠癌虽然具有组织分化更差的特点,但往往具有较好的预后且有不同的临床监测与管理,因此及时区分两者具有重要的临床意义。在临床,现有3种常用的林奇综合征检测方法:免疫组化、微卫星不稳定性分析、DNA测序。这3种检查方法相互补充、相辅相成,免疫组织化学方法是一个基础方法,DNA测序则是林奇综合征最权威的检测方法。但它们各自均有一定局限性,尤其是作为广泛应用的基本手段——免疫组化方法,它的异质性问题尚需要进一步分析研究。

参考文献:

- [1] LICCARDO R, de ROSA M, IZZO P, et al. Novel implications in molecular diagnosis of Lynch syndrome[J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2017, 2017: 2595098.
- [2] BELLIZZI A M, FRANKEL W L. Colorectal cancer due to deficiency in DNA mismatch repair function; a review[J]. *Advances in anatomic pathology*, 2009, 16(6): 405-417.
- [3] Classics in Oncology. Heredity with reference to carcinoma as shown by the study of the cases examined in the pathological laboratory of the University of Michigan, 1895-1913. By Aldred Scott Warthin. 1913[J]. *CA Cancer J Clin*, 1985, 35(6): 348-359.
- [4] STOFFEL E, MUKHERJEE B, RAYMOND V M, et al. Calculation of risk of colorectal and endometrial cancer among patients with Lynch syndrome[J]. *Gastroenterology*, 2009, 137(5): 1621-1627.
- [5] WALSH M D, CUMMINGS M C, BUCHANAN D D, et al. Molecular, pathologic, and clinical features of early-onset endometrial cancer: identifying presumptive Lynch syndrome patients[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(6): 1692-1700.
- [6] 李小会, 赵文婕, 刘变英. 林奇综合征诊疗进展[J]. *中华结直肠疾病电子杂志*, 2016, 5(6): 512-517.
LI X H, ZHAO W J, LIU B Y. Advances in the diagnosis and treatment of Lynch syndrome[J]. *Chin J Colorec Dis (Electronic Edition)*, 2016, 5(6): 512-517.
- [7] PALOMAKI G E, Mc CLAIN M R, MELILLO S, et al. EGAPP supplementary evidence review, DNA testing strategies aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome[J]. *Genet Med*, 2009, 11(1): 42-65.
- [8] PROVENZALE D, GUPTA S, AHNEN D J, et al. NCCN guidelines insights: colorectal cancer screening, version 1. 2018[J]. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network: JNCCN*, 2018, 16(8): 939-949.
- [9] BUZA N, ZIAI J, HUI P. Mismatch repair deficiency testing in clinical practice[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2016, 16(5): 591-604.
- [10] SHIA J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome, part I. The utility of immunohistochemistry[J]. *J Mol Diagn*, 2008, 10(4): 293-300.
- [11] LADABAUM U, WANG G, TERDIMAN J, et al. Strategies to identify the Lynch syndrome among patients with colorectal cancer: a cost-effectiveness analysis[J]. *Annals of Internal Medicine*, 2011, 155(2): 69-79.
- [12] BARROW E, JAGGER E, BRIERLEY J, et al. Semiquantitative assessment of immunohistochemistry for mismatch repair proteins in Lynch syndrome[J]. *Histopathology*, 2010, 56(3): 331-344.
- [13] GOULD-SUAREZ M, EL-SERAG H B, MUSER B, et al. Cost-effectiveness and diagnostic effectiveness analyses of multiple algorithms for the diagnosis of Lynch syndrome[J]. *Dig Dis Sci*, 2014, 59(12): 2913-2926.
- [14] de JONG A E, van PUIJENBROEK M, HENDRIKS Y, et al. Microsatellite instability, immunohistochemistry, and additional PMS2 staining in suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(3): 972-980.
- [15] SHI A J, ZHANG L, SHIKE M, et al. Secondary mutation in a coding mononucleotide tract in MSH6 causes loss of immunoreactivity of MSH6 in colorectal carcinomas with MLH1/PMS2 deficiency[J]. *Mod Pathol*, 2013, 26(1): 131-138.
- [16] RADU O M, NIKIFOROVA M N, FARKAS L M, et al. Challenging cases encountered in colorectal cancer screening for Lynch syndrome reveal novel findings: nucleolar MSH6 staining and impact of prior chemoradiation therapy[J]. *Hum Pathol*, 2011, 42(9): 1247-1258.
- [17] JOOST P, VEURINK N, HOLCK S, et al. Heterogenous mismatch-repair status in colorectal cancer [J]. *Diagn Pathol*, 2014, 9: 126.
- [18] KLARSKOV L, LADELUND S, HOLCK S, et al. Inter-observer variability in the evaluation of mismatch repair protein immunostaining[J]. *Hum Pathol*, 2010, 41(10): 1387-1396.
- [19] OVERBEEK L I, LIGTENBERG M J, WILLEMS R W, et

al. Interpretation of immunohistochemistry for mismatch repair proteins is only reliable in a specialized setting[J]. *The American Journal of Surgical Pathology*, 2008, 32(8):1246-1251.

[20] MANGOLD E, PAGENSTECHE C, FRIEDL W, et al. Tumours from MSH2 mutation carriers show loss of MSH2 expression but many tumours from MLH1 mutation carriers exhibit weak positive MLH1 staining[J]. *J Pathol*, 2005, 207(4):385-395.

[21] ZHANG L. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syn-

drome. Part II. The utility of microsatellite instability testing[J]. *J Mol Diagn*, 2008, 10(4):301-307.

[22] WAGNER A, BARROWS A, WIJNEN J T, et al. Molecular analysis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the United States; high mutation detection rate among clinically selected families and characterization of an American founder genomic deletion of the MSH2 gene[J]. *Am J Hum Genet*, 2003, 72(5):1088-1100.

[23] SHIA J, ELLIS N A, KLIMSTRA D S. The utility of immunohistochemical detection of DNA mismatch repair gene proteins[J]. *Virchows Arch*, 2004, 445(5):431-441.

Comparison and Application of Screening Methods for Colorectal Cancer Associated with Lynch Syndrome

ZOU Cancan, TANG Yi, LI Qingshu, XIAO Ming, LI Ming, YANG Lian, LI Xian, WANG Yalan

(Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: [Purposes] To compare the advantages and limitations of the current screening methods of Lynch syndrome-related colorectal cancer for better application. [Methods] The screening methods of Lynch syndrome-related colorectal cancer were compared and summarized in the form of review. [Findings] The advantage of immunohistochemical detection method is that the technology is relatively simple and inexpensive, suitable for any organization and can detect cases of microsatellite instability test failure; The limitation is that the results may be affected by various biological and technical factors, and the heterogeneity of staining may bring difficulties to the doctor, and there may be false positive results. The advantage of the microsatellite detection method is that the results are easier to interpret and easier to repeat. The disadvantages are that the detectable tissues are not universally applicable, the analysis requires normal tissues for comparison, and there may be false negative or false positive results. DNA sequencing is the only method of diagnosis of Lynch syndrome, but it is expensive and time-consuming. [Conclusions] Several screening methods have their own advantages and disadvantages and complement each other. Correct understanding is conducive to correct selection and thus improve the screening rate of Lynch syndrome.

Keywords: Lynch syndrome-related colorectal cancer; clinicopathological features; comparison of screening methods

(责任编辑 黄 颖)