

# 微卫星不稳定与大肠癌相关性的研究进展

田 力, 曹悦鞍

[摘要] 大肠癌(colorectal cancer, CRC)是位于第4位的常见恶性肿瘤,居肿瘤死亡原因的第3位。近年来,我国每年新发大肠癌病例高达40余万例,且发病率呈上升趋势。大肠癌在我国发病的上升速度远远超过2%的国际水平,青年人患大肠癌的比例在不断攀升,且男性多于女性。近年来,随着微卫星不稳定概念在肿瘤分子生物学中的提出,越来越多的研究认为大肠癌的发生和发展与微卫星不稳定密切相关,并在其预后过程中起着重要的作用。

[关键词] 大肠癌;微卫星;错配修复基因

[中图分类号] R735.3<sup>+</sup>4

[文献标志码] A

[文章编号] 1009-3427(2011)03-0169-04

迄今为止,大肠癌的发生和发展的确切机制尚未阐明,但一般认为是一个涉及多因素、多步骤、多基因改变的复杂过程,包括癌基因的激活、抑癌基因的失活,以及微卫星不稳定等。以往的研究认为肿瘤的分期是影响肿瘤发展和预后的唯一因素。自1993年发现错配修复基因缺陷与大肠癌的发病相关以来<sup>[1-2]</sup>,越来越多的实验研究证实错配修复基因的失活在大肠癌的发生及预后中起着重要的作用。本文归纳了近年来对错配修复基因的相关研究,阐述其在大肠癌发生、发展过程中的作用机制,并探讨其临床预后、预测的意义。

## 1 错配修复基因系统的分子基

微卫星是分布生物基因种系中串联的重复序列,包含单核苷酸、双核苷酸或多核苷酸重复序列,如(A)<sub>n</sub>或(CA)<sub>n</sub>。这些重复序列突变易积累,主要是因为DNA聚合酶在DNA合成过程中不能将DNA双链有效正确配对起来。微卫星不稳定(microsatellite instability, MSI)最常见的错误是碱基错误配对,逃脱了DNA聚合酶、插入-缺失回路的本身固有的校对功能。肿瘤的MSI是指与正常细胞相比,肿瘤细胞中某一微卫星长度发生改变,也称“复制错误”表型或“普遍性体细胞突变”。所谓“普遍性体细胞突变”是指在人体细胞基因组中普遍存在的被称为微卫星的简单重复序列拷贝数的改变。MSI分为3类,①高频MSI(MSH):2个或多个微卫星位点不稳定(或检测的大板标记中大于30%的位点不稳定);②低频MSI:只有1个微卫星位点不稳定(10%~30%标记位点不稳定);③微卫星稳定(microsatellite stability, MSS):也称为无不稳定微卫星位点(小于10%标记位点不稳定)。MSI的发生与错配修复基因系统缺失密切相关。MSH通常称为dMMR,MSI,MSS称为PMMR。

错配修复基因系统(mismatch repair, MMR)是机体内DNA修复机制的一种形式,广泛存在于生物体内,在防止基因突变、维持基因组稳定性和DNA复制高保真的过程中起关键作用,具有对微卫星监测及其错误的更正修复功能。人类错配修复系统是人体细胞中存在的一种能修复DNA碱基错配的安全保障系统,它由一系列能特异性识别、双向切除并修复错配碱基的酶分子组成,对保持遗传物质的稳定性和完整性、避免遗传突变的产生具有重要作用。MMR系统主要包含以下几种蛋白:MLH1、MSH2、MSH3、MSH6和PMS2,它们之间相互连接形成异源二聚体。MSH2分别与MSH6、MSH3配对形成MutS $\alpha$ 复合物和MutS $\beta$ 。MutS $\alpha$ 可识别单个碱基错配,MutS $\beta$ 可识别2~4个碱基甚至更多的插入或缺失错配<sup>[3]</sup>。MLH1则分别与PMS2、PMS1和MLH3形成MutL $\alpha$ 、MutL $\beta$ 和MutL $\gamma$ 复合物。这些蛋白复合物一旦检测到碱基错配,就能与有关的酶配合,切除含有错配的DNA片段,并合成新的DNA片段以代替被切除的部分,进而完成错配DNA链的修复过程。MMR缺失会导致DNA链错配的积聚,从而导致MSI。

## 2 MSI与大肠癌

2.1 MSI引起结直肠癌的分子机制 MSI引发的特殊基因和信号转导途径突变,是导致大肠癌的机制之一。错配修复基因缺失(deficient mismatch repair, dMMR)引起微卫星不稳定,微卫星重复序列中30多个基因突变,如DNA修复蛋白MRE11A、hRAD50、转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ )受体II、胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)受体II、前凋亡因子Bax、错配修复蛋白MSH3和MSH6等<sup>[4]</sup>。这些基因在细胞功能及转导途径中发挥多种作用,其突变的急速积聚可诱发大肠癌的发生。

BRAF基因突变已被证实在大肠癌发病机制中

[作者单位] 100048 北京,海军总医院特需医疗部(田力,曹悦鞍)

发挥重要作用, BRAF15 外显子基因编码丝氨酸-苏氨酸激酶, 在促分裂原活化蛋白激酶信号通路 (RAS/RAF/MEK/MAP) 起重要作用, 而 RAS/RAF/MEK/MAP 激酶途径在胞内信号转导途径中有重要作用, 调节细胞的增殖、分化和凋亡。BRAF 突变可导致促凋亡蛋白 (Bcl-2 interacting mediator of cell death, Bim) 的抑制而抑制细胞凋亡, 促进结肠肿瘤的发展<sup>[5]</sup>。BRAF 磷酸化在人类肿瘤中能激活促分裂原活化蛋白 (mitogen-activated protein, MAP)/细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulating kinase, ERK) 1/2, 并磷酸化 ERK1/2, 激活 MAPK (促分裂原活化蛋白激酶), 即激活了 RAF-促分裂原活化蛋白激酶信号通路 (RAF-MEK-ERK1/2); ERK1/2 被激活后, 使 Bim 磷酸化, 阻止其绑定到 Bcl-2 目标上, 从而抑制细胞凋亡<sup>[6]</sup>。

BRAF 突变在散发的 hMLH1 甲基化的结肠癌中普遍存在, 已有研究表明 BRAF 突变与 DNA 错配修复缺乏导致的 hMLH1 甲基化相关。例如有实验证实 87% 的有 hMLH1 甲基化的结肠癌细胞系中存在 BRAF 突变, 而仅 4% 的 hMLH1 未甲基化的细胞系中存在 BRAF 突变<sup>[7,8]</sup>。Domingo 等<sup>[9]</sup> 研究显示, BRAF V600E 突变在散发性 MSI-H 肿瘤中占 40% (82/206), 但是在 111 例遗传性非息肉性结肠癌 (hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC) 中未检测出该突变。另一实验研究显示, 任何 HNPCC 患者中均未检测到 BRAF V600E 突变<sup>[10]</sup>。结果显示, BRAF 突变经常出现在 hMLH1 甲基化散发性结肠癌 (colorectal cancer, CRC) 患者中, 但是不会出现在 HNPCC 相关的肿瘤患者中。这种 BRAF 突变的差异可能会用于鉴别散发的 MSI-H CRC 患者和 HNPCC 患者。Nagasaka 等<sup>[7]</sup> 检测了 11 个位点的启动子的甲基化状态与 BRAF 突变的相关性, 发现 BRAF 突变与平均 7.2 个 (95% CI: 6.6~7.9) 位点甲基化相关。而在散发性大肠癌中, hMLH1 甲基化是导致 MSI 的主要因素。很多实验证实, BRAF 突变与 MSI 高度相关<sup>[8,11-12]</sup>。有报道 BRAF 突变仅在 MSI-H 肿瘤中存在, 而 KRAS 突变在 MSI-L 或 MSS 肿瘤中可被检测出<sup>[13]</sup>。故可以推测, 散发性 CRC 的 MSI 肿瘤发展可能经由 BRAF 途径, 但相关机制至今没有被详细阐述。

磷脂酰肌醇 3 激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) 是肿瘤形成的启动子之一, PIK3CA 在 PI3K 通路中发挥关键作用, 在 30% CRC 患者中发生 PIK3C 突变<sup>[14]</sup>。MSI 肿瘤 PIK3CA 突变多于 MSS 肿瘤<sup>[14-15]</sup>。MSI 肿瘤可能也经由 PI3K/ATK/

mTOR (磷酸酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白) 信号通路。

BRAF 突变, KRAS 突变, CpG 岛甲基化, PIK3C 突变、微卫星不稳定性都在结肠直肠癌中被高频检测到。近年来研究热点包括四者之间是否存在相关性, 以及它们之间的相互作用、导致结肠癌发生、发展的机制。

### 2.2 遗传性非息肉性结肠癌与散发性结肠癌 MSI 的发生机制

遗传性非息肉性结肠癌与散发性结肠癌 dMMR 发生机制不同。MLH1、MSH2、MSH6 和 PMS2 等基因系突变易导致 HNPCC 的发生<sup>[16]</sup>。基因型是 HNPCC 的诊断金标准。79%~93% HNPCC 为 MSI 表型。MSI 作为 HNPCC 的基因标志物作用已在临床中得到认可。由 MMR 基因变异引起的 HNPCC MSI 阳性病例随年龄增长逐渐下降, 大于 50 岁患者只有 17%。MMR 基因突变引起男性大肠癌发生率为 60%~70%, 女性则为 30%~40%<sup>[17-18]</sup>。HNPCC 是常染色体显性遗传疾病, 占结肠癌总发病率的 2%~3%<sup>[19]</sup>。其特征是发病年龄轻, 多小于 50 岁, 有家族史, 以右半结肠癌为主, 常伴有同时和异时结肠原发癌及结肠外肿瘤, 组织病理学符合 Lynch syndrome (印戒细胞、生长缓慢、类克隆病反应、黏蛋白含量 > 50%、肿瘤淋巴细胞浸润)。该类患者预后较好, 5 年生存期大于散发性结肠癌患者。

在 MSI-H 散发性结肠癌中, 通常发病年龄超过 70 岁, 主要是 MLH1 的 CpG 岛高甲基化表型致 dMMR 引起, 肿瘤抑制基因转录沉默<sup>[8]</sup>。MLH1 沉默占 MSI-H 病例的 95%, MSH2、MSH6 分别占 MSI-H 的 5% 和不足 1%<sup>[20]</sup>。与 MSI-L、MSS 相比, MSI-H 病例有显著特点, 即发病年龄相对年轻、分化高、发病部位为近段结肠、分期早、不易转移, 且预后较好<sup>[21]</sup>。

### 3 MSI 在结肠癌预后及治疗中的作用

一些临床研究表明, CRC 中 MSI 发生率波动于 8%~20%, 这与肿瘤分期相关。II 期患者 MSI 发生率最高为 20%, II 期为 12%, IV 期发生率最低为 4%<sup>[19,22]</sup>。其原因还未明确。

MSI 表型主要有 3 个临床用途, 即: CRC 预后; 预测对化疗药物的反应, 如氟尿嘧啶 (5-FU)、伊立替康等; 对 HNPCC 的基因评估。MSI CRC 预后相对 MSS 更好, 不易发生淋巴结转移和远处转移。这个结论被随后的临床研究所证实<sup>[23]</sup>。对 32 个临床研究数据进行 meta 分析, 共包含了 7 642 例 CRC 病例, 其中 1 277 病例表型为 MSI, 分析结果显示出

MSI 肿瘤患者预后良好优势<sup>[22]</sup>。提示 MSI 在 CRC 中预后价值的优越性。2009 年美国临床肿瘤学会 (ASCO) 年度会议上提出 MSI 在 II 期 CRC 预后价值较 II 期更显著<sup>[24]</sup>。

MSI 作为 5-FU、伊立替康等化疗药物敏感性的预测分子标志物,目前还有争论<sup>[25,26]</sup>。Sargent 等<sup>[27]</sup> 回顾性研究包含 5 个临床中心的随机对照研究 5-FU 为基础的辅助化疗方案对 II 期、III 期 CRC 患者的疗效,使用奥沙利铂、伊立替康、口服氟尿嘧啶等药物患者被排除在研究范围外。结果证实, dMMR 在 II 期 CRC 发生频率更高,行 5-FU 为基础的化疗方案对 PMMR 和 II 期 dMMR CRC 患者有效,可提高其无病生存期 (disease-free survival, DFS)。但对于 dMMR II 期 CRC 患者,化疗不仅没有疗效优势,甚至于对 MSI CRC 患者有危害,可显著减低其 DFA 和总生存期。

伊立替康是拓扑异构酶 I 抑制剂。拓扑异构酶 I 可引起 DNA 链在复制和转录过程中出现暂时缺口。伊立替康可结合到 DNA-拓扑异构酶 I 复合物上,阻碍 DNA 再连接,导致 DNA 双链分解。如果 DNA 修复系统不能发挥作用,最终导致细胞的凋亡。微卫星 MRE11A、hRAD50 突变会引起 DNA 修复功能障碍,理论上可能对伊立替康有效。有 4 个临床研究分析伊立替康对 MSI CRC 的治疗作用。其中,第 1 个研究示单中心 72 例 CRC 转移患者按微卫星状态分类,接受伊立替康治疗的临床试验<sup>[28]</sup>。第 2 个研究是美国肿瘤与血液病学研究组 (GALGB) 治疗方案前瞻性研究 702 例 II 期 CRC 患者,比较 5-FU 联合伊立替康与单药 5-FU 辅助化疗疗效比较<sup>[29]</sup>,数据显示 MSI-H 联合方案治疗组有 5 年无病生存期优势,但无显著性优势。MSS 肿瘤患者未显示出联合化疗的优势。在 2009 ASCO 年会上提供的研究数据未证实前者结论。在这个研究中,回顾性分析了一项随机试验 PETACG-3 试验中 1 254 例 II 期和 III 期 CRC 患者,其中 188 例 MSI-H 患者伊立替康治疗后生存期无改善。Meta 分析也未得到 IV 期 MSI CRC 患者接收伊立替康为基础的化疗方案的有效性<sup>[28,30]</sup>。因此,还需更多的临床研究来证实伊立替康对 MSI 肿瘤的治疗作用。

基于上述的研究,2011 年结直肠癌的美国国立综合癌症网络 (NCCN) 指南提出,对小于 50 岁的 CRC 患者,应该考虑行 MMR 基因检测。II 期 MSI-H CRC 患者预后好,但 5-FU 辅助化疗不能使其受益。

许多研究结果证实,MSI 是大肠癌的发病机制之一。MSI 肿瘤信号通路的研究对其治疗策略提

供了新思路。例如,微卫星 MRE11A、hRAD50 突变会引发 DNA 双链分解修复系统缺失,体外细胞实验证实 PARP-1 抑制剂可抑制 MSI 细胞系的生长和 MRE11A 的表达水平,有可能成为治疗 MSI 肿瘤的有效靶向剂。由于连接图谱生物技术的应用,LY-294002 和西罗莫司 (PI3K/ATK/mTOR 信号通路靶向剂) 会引起基因表达改变,从而抑制 MSI 肿瘤的表达<sup>[31]</sup>。这个发现也进一步明确了 MSI 肿瘤的 PI3K/ATK/mTOR 信号通路,并帮助研发新的靶向治疗剂。

随着分子生物实验技术的提高,MMR 的基因检测相对简单、方便,准确率高。MMR 在大肠癌发生、发展中起重要作用,是大肠癌预后及疗效预测的分子标志之一。但仍需更多的大宗临床试验及数据来完善 MSI 在 CRC 中的作用。尤其在中国,尚未有临床试验进行此研究。不同的 MMR 基因在不同类型的 CRC 中发挥的作用不同,具体作用机制仍需进一步研究予以阐明,是否存在其他的错配修复基因及其潜在作用需要进一步探索。dMMR 的遗传标记的明确和快速准确的检测方法也需要进一步研究。这些研究的进一步深入会对大肠癌的预防、早期诊断及治疗提供更大的帮助。

## 【参考文献】

- [1] Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer [J]. *Science*, 1993, 260(5109): 812-816.
- [2] Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, et al. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis [J]. *Nature*, 1993, 363(6429): 558-561.
- [3] Dunlop MG, Farrington SM, Nicholl I, et al. Population carrier frequency of hMSH2 and hMLH1 mutations [J]. *Br J Cancer*, 2000, 83(12): 1643-1645.
- [4] Duval A, Hamelin R. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(9): 2447-2454.
- [5] Symvoulakis EK, Zaravinos A, Panoutsopoulos D, et al. Highly conserved sequence of exon 15 BRAF gene and KRAS codon 12 mutation among Greek patients with colorectal cancer [J]. *Int J Biol Markers*, 2007, 22(1): 12-18.
- [6] Wickenden JA, Jin H, Johnson M, et al. Colorectal cancer cells with the BRAF(V600E) mutation are addicted to the ERK1/2 pathway for growth factor-independent survival and repression of BIM [J]. *Oncogene*, 2008, 27(57): 7150-61.

- [7] Nagasaka T, Sasamoto H, Notohara K, et al. Colorectal cancer with mutation in BRAF, KRAS, and wild-type with respect to both oncogenes showing different patterns of DNA methylation[J]. *J Clin Oncol*, 2004, 22(22): 4584-4594.
- [8] Brim H, Mokarram P, Naghibalhossaini F, et al. Impact of BRAF, MLH1 on the incidence of microsatellite instability high colorectal cancer in populations based study[J]. *Mol Cancer*, 2008, 7: 68.
- [9] Domingo E, Laiho P, Ollikainen M, et al. BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing[J]. *J Med Genet*, 2004, 41(9): 664-668.
- [10] Bettstetter M, Dechant S, Ruenmele P, et al. Distinction of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and sporadic microsatellite-unstable colorectal cancer through quantification of MLH1 methylation by real-time PCR[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(11): 3221-3228.
- [11] Ang PW, Li WQ, Soong R. BRAF mutation is associated with the CpG island methylator phenotype in colorectal cancer from young patients[J]. *Cancer Lett*, 2009, 273(2): 221-224.
- [12] Tanaka H, Deng G, Matsuzaki K, et al. BRAF mutation, CpG island methylator phenotype and microsatellite instability occur more frequently and concordantly in mucinous than non-mucinous colorectal cancer[J]. *Int J Cancer*, 2006, 118(11): 2765-2771.
- [13] Kumar K, Brim H, Giardiello F, et al. Distinct BRAF (V600E) and KRAS mutations in high microsatellite instability sporadic colorectal cancer in African Americans[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(4): 1155-61.
- [14] Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, et al. High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers[J]. *Science*, 2004, 304(5670): 554.
- [15] Abubaker J, Bavi P, Al-Harbi S, Ibrahim M, et al. Clinicopathological analysis of colorectal cancers with PIK3CA mutations in Middle Eastern population[J]. *Oncogene*, 2008, 27(25): 3539-3545.
- [16] Hendriks YM, de Jong AE, Morreau H, et al. Diagnostic approach and management of Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma): a guide for clinicians[J]. *CA Cancer J Clin*, 2006, 56(4): 213-225.
- [17] Pihl O V, Castells A, Andreu M, et al. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer[J]. *JAMA*, 2005, 293(16): 1986-1994.
- [18] Chen S, Wang W, Lee S, et al. Prediction of germline mutations and cancer risk in the Lynch syndrome[J]. *JAMA*, 2006, 296(12): 1479-1487.
- [19] Hampel H, Frankel WL, Martin E, et al. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer)[J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(18): 1851-1860.
- [20] Cunningham JM, Kim CY, Christensen ER, et al. The frequency of hereditary defective mismatch repair in a prospective series of unselected colorectal carcinomas[J]. *Am J Hum Genet*, 2001, 69(4): 780-790.
- [21] Papat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis[J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(3): 609-618.
- [22] Koopman M, Kortman GA, Mekenkamp L, et al. Deficient mismatch repair system in patients with sporadic advanced colorectal cancer[J]. *Br J Cancer*, 2009, 100(2): 266-273.
- [23] Watanebe T, Wu TT, Catalano PJ, et al. Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer[J]. *N Engl J Med*, 2001, 344(16): 1196-1206.
- [24] Vilar E, Gruber SB. Microsatellite instability in colorectal cancer—the stable evidence[J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2010, 7(3): 153-162.
- [25] Jover R, Zapater P, Castells A, et al. Mismatch repair status in the prediction of benefit from adjuvant fluorouracil chemotherapy in colorectal cancer[J]. *Gut*, 2006, 55(6): 848-855.
- [26] Des Guetz G, Schischmanoff O, Nicolas P, et al. Does microsatellite instability predict the efficacy of adjuvant chemotherapy in colorectal cancer? A systematic review with meta-analysis[J]. *Eur J Cancer*, 2009, 45(10): 1890-1896.
- [27] Sargent DJ, Marsoni S, Monges G, et al. Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(20): 3219-3226.
- [28] Fallik D, Borrini F, Boige V, et al. Microsatellite instability is a predictive factor of the tumor response to irinotecan in patients with advanced colorectal cancer[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(18): 5738-5744.
- [29] Deng G, Bell I, Crawley S, et al. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(1 Pt 1): 191-195.
- [30] Koopman M, Antonini NF, Douma J, et al. Sequential versus combination chemotherapy with capecitabine, irinotecan, and oxaliplatin in advanced colorectal cancer (CAIRO): a phase III randomised controlled trial[J]. *Lancet*, 2007, 370(9582): 135-142.
- [31] Vilar E, Mukherjee B, Kuick R, et al. Gene expression patterns in mismatch repair-deficient colorectal cancers highlight the potential therapeutic role of inhibitors of the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mammalian target of rapamycin pathway[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(8): 2829-2839.

(收稿日期: 2011-04-22)