

- guinea pig model of asthma[J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 650(1):458-464.
- [16] ANTWI A O, OBIRI D D, OSAFO N. Stigmasterol modulates allergic airway inflammation in guinea pig model of ovalbumin-induced asthma[J]. *Mediators Inflamm*, 2017, 2017:2953930.
- [17] 吕伟伟, 郑锐, 谭明旗. PI3K/Akt信号通路在哮喘气道重塑中的研究进展[J]. *医学综述*, 2018, 24(15):2961-2965.
- [18] YANG N, ZHANG H, CAI X, et al. Epigallocatechin-3-gallate inhibits inflammation and epithelial-mesenchymal transition through the PI3K/AKT pathway via upregulation of PTEN in asthma[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(2): 818-828.
- [19] KIM S R, LEE K S, PARK H S, et al. HIF-1 α inhibition ameliorates an allergic airway disease via VEGF suppression in bronchial epithelium[J]. *Eur J Immunol*, 2010, 40(10):2858-2869.
- [20] CHOI Y H, JIN G Y, LI L C, et al. Inhibition of protein kinase C delta attenuates allergic airway inflammation through suppression of PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 α /VEGF pathway[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11):e81773.
- [21] PENG J, LI X M, ZHANG G R, et al. TNF-TNFR2 signaling inhibits Th2 and Th17 polarization and alleviates allergic airway inflammation[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2019, 178(3):281-290.
- [22] YUAN L, DU X, TANG S, et al. ITGB4 deficiency induces senescence of airway epithelial cells through p53 activation[J]. *FEBS J*, 2019, 286(6):1191-1203.
- [23] LAMBRECHT B N, HAMMAD H. The airway epithelium in asthma[J]. *Nat Med*, 2012, 18(5):684-692.
- [24] TAO X, CONSTANT S, JORRITSMA P, et al. Strength of TCR signal determines the costimulatory requirements for Th1 and Th2 CD4+T cell differentiation[J]. *J Immunol*, 1997, 159(12):5956-5963.
- [25] LV J, SUN B, MAI Z, et al. STAT3 potentiates the ability of airway smooth muscle cells to promote angiogenesis by regulating VEGF signalling[J]. *Exp Physiol*, 2017, 102(5): 598-606.

微卫星状态与结直肠癌临床病理特征、外周血T细胞及基因突变的关系

钟国方, 张 航, 袁 霞* (惠州市中心人民医院肿瘤内科, 广东惠州 516000)

摘要: 目的 了解微卫星状态与结直肠癌临床病理特征、外周血T淋巴细胞及基因突变的关系。方法 180例结直肠癌患者采用多重荧光PCR毛细管电泳法检测微卫星状态, 免疫芯片法检测外周血T淋巴细胞, 高通量测序方法检测基因突变状态, 分析微卫星状态与结直肠癌临床病理特征、外周血T淋巴细胞及基因突变的关系。结果 微卫星高度不稳定(MSI-H)患者<60岁、结肠癌、低分化型、PIK3CA突变、CD3⁺≥1 372个/ μ L、CD4⁺≥766个/ μ L、CD8⁺≥438个/ μ L均高于微卫星稳定(MSS)/微卫星低度不稳定(MSI-L)者($P<0.01$ 或 0.05)。结论 结直肠癌患者微卫星状态与年龄、发病部位、分化程度、外周血T淋巴细胞、PIK3CA基因突变密切相关。

关键词: 结直肠癌; 微卫星不稳定; T淋巴细胞; 基因突变

中图分类号: R 735.3

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2021)05-0557-05

Relationship between microsatellite status and clinicopathological features, peripheral blood T cells and gene mutations in colorectal cancer

ZHONG Guo-fang, ZHANG Hang, YUAN Xia* (Department of Oncology, Huizhou Central People's Hospital, Huizhou 516000, China)

Abstract: Objective To study the relationship between microsatellite status and clinicopathological characteristics, peripheral blood T cells and gene mutations in colorectal cancer (CRC). Methods The microsatellite status, peripheral blood T cells and gene mutations of 180 CRC patients were determined by multiple fluorescent PCR with capillary

基金项目: 惠州市科技局重大项目(No. 2016C0405020)

收稿日期: 2020-11-15; 修订日期: 2021-05-21

作者简介: 钟国方(1996-), 男, 硕士, 主治医师

通信作者: 袁 霞, 女, 博士, 主任医师, E-mail: yuanxia71@hotmail.com

electrophoresis, immunomicroarray, high-throughput sequencing method, respectively. The relationship between microsatellite status and clinicopathological characteristics, peripheral blood T cells and gene mutations was analyzed.

Results Compared with microsatellite stability and microsatellite instability-low, age<60 years, colon cancer, poorly differentiated tumor, PIK3CA mutation, $CD3^+ \geq 1\ 372/\mu L$, $CD4^+ \geq 766/\mu L$, and $CD8^+ \geq 438/\mu L$ were more common in patients with microsatellite instability-high ($P<0.01$ or 0.05). **Conclusion** The microsatellite status is closely associated with age, location, differentiation, peripheral blood T lymphocytes, and PIK3CA mutation in CRC patients.

Key words: colorectal cancer; microsatellite instability; T lymphocyte; gene mutation

结直肠癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一,其发病率及病死率近年来呈上升趋势,严重危害人类的健康^[1]。研究表明,微卫星(MS)状态与结直肠癌的发展、预后、疗效、遗传等均有相关^[2-4]。所有结直肠癌患者均被推荐完善微卫星状态检测^[5]。肿瘤的发生、发展机制复杂,影响因素众多,基因突变在结直肠癌的发生、发展中起着重要作用,并一定程度上影响着患者的预后^[6]。T淋巴细胞亚群是人体内主要的细胞免疫系统,是影响结直肠癌患者预后的危险因素^[7],但外周血T淋巴细胞亚群与微卫星状态的关系尚不清楚。本文通过分析微卫星状态与结直肠癌的临床病理特征、外周血T细胞及基因突变的关系,以期对结直肠癌患者的诊治提供参考。

1 资料和方法

1.1 一般资料

选取2017年11月至2020年11月在惠州市中心人民医院诊断为结直肠癌并完善卫星状态、外周血T淋巴细胞或基因检测患者180例,经病理确诊为腺癌,TNM分期为Ⅱ~Ⅳ期,排除其他部位恶性肿瘤。

1.2 方法

微卫星状态采用多重荧光PCR毛细管电泳法检测,该方法是微卫星状态检测的金标准,灵敏度高,特异性强。检测位点包括6个单核苷酸重复标志物(NR21、NR24、NR27、BAT25、BAT26和MONO27)。结果出现2个或以上的不稳定为微卫星高度不稳定(MSI-H),存在1个位点为微卫星低度不稳定(MSI-L),而无不稳定位点则为微卫星稳定(MSS)^[8]。基因突变采用高通量测序方法进行检测,标本类型为石蜡切片或全血,同时检测肿瘤相关突变热点区域的单碱基替换突变和插入缺失突变。采用多重PCR技术靶向捕获,一次实验同时对92个扩增子进行高通量测序,目标区域的平均覆盖度不低于1 000倍,检测灵敏度的下限为1%。外周血T淋巴细胞亚群检测基于抗原抗体特异性反应原理,将人体外周血中表达有CD抗原的细胞固定于单克隆抗体包被玻片上,通过淋洗、染色等操作后,对特异性细胞进行自动计数仪自

动计数。Semibio CD系列细胞检测玻片,将特异性抗体事先包被在芯片基板上,样本中表达有该特异性抗原细胞与芯片接触反应后,特异性细胞被分离固定,再通过自动计数仪对固定细胞分析。外周血T淋巴细胞亚群检测选用化疗前的检测结果。结合患者的临床资料及相关检查结果,根据微卫星状态划分为MSI-H和MSS/MSI-L患者,分析不同微卫星状态与临床病理特征、外周血T淋巴细胞水平及基因突变间的关系。

1.3 统计学处理

采用SPSS 25.0统计软件进行分析,计数资料以频数或%表示,采用 χ^2 检验。外周血T淋巴细胞根据受试者工作特征曲线(ROC)判断界值。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 基线特征

纳入180例患者中男105例,女75例;年龄29~87岁,平均(57.15 ± 11.60)岁;直肠癌64例(35.6%),结肠癌116例(64.4%),其中左半结肠癌为75例(64.7%),右半结肠癌为41例(35.3%);分化类型(检测缺失7例):高分化1例(0.6%),中分化134例(77.4%),低分化38例(22.0%);TNM分期:Ⅲ期占42.2%,Ⅱ期占36.7%,Ⅳ期占21.1%;153例完成肿瘤化疗前外周血T细胞检测, $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 平均值均处于正常参考值范围;180例完成微卫星状态检测,MSI-H患者19例(10.6%),MSS/MSI-L患者161例(89.4%);159例完成基因突变状态检测,KRAS突变率最高,有76例发生突变,其余分别为PIK3CA(15.0%)、TP53(8.3%)、NRAS(4.4%)、BRAF(3.3%)、ERBB2(2.2%)、EGFR(2.2%)、AKT1(1.7%)、MET(1.1%)。

2.2 结直肠癌患者临床病理特征与微卫星状态的关系

MSI-H患者<60岁的比例为89.5%,高于MSS/MSI-L患者的56.5%($P<0.01$)。在结直肠癌中,MSI-H患者肿瘤发病部位在结肠的比例较MSS/MSI-L患

者更高,分别为89.5%和61.5%,差异有统计学意义($P<0.05$)。而在结肠癌中,MSI-H患者更常见于右半结肠(64.7%,11/17),而MSS/MSI-L患者更常见于左半结肠(69.7%,69/99),差异有统计学意义($P<0.01$)。

180例患者中,173例有明确的分化类型,7例无法鉴定分化类型。MSI-H与MSS/MSI-L患者均以中高分化居多,但MSI-H患者低分化型的比例明显高于MSS/MSI-L患者(47.4% vs 18.8%),差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 结直肠癌患者临床病理特征与微卫星状态的关系(例)

特征	MSS/MSI-L	MSI-H	P值
年龄/岁			0.006
<60	91	17	
≥60	70	2	
性别			0.346
男	92	13	
女	69	6	
发病部位			0.016
结肠	99	17	
直肠	62	2	
分化类型			0.011
低分化	29	9	
中+高分化	125	10	
TNM分期			0.306
Ⅱ	57	9	
Ⅲ/Ⅳ	104	10	

分化类型检测缺失7例(均为MSS/MSI-L),其余指标均MSS/MSI-L 161例和MSI-H 19例

2.3 结直肠癌患者外周血T细胞计数与微卫星状态的关系

180例患者中153例行肿瘤化疗前外周血T细胞检测(MSS/MSI-L137例,MSI-H 16例)。根据ROC曲线及AUC算得CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺及CD4⁺/CD8⁺的最佳界值分别为1 372、766、438和1.17。MSI-H患者CD3⁺≥1 372个/μL、CD4⁺≥766个/μL、CD8⁺≥438个/μL的比例明显高于MSS/MSI-L患者($P<0.05$ 或0.01),

而两组的CD4⁺/CD8⁺差异无统计学意义($P>0.05$)。见表2。

2.4 结直肠癌患者的基因突变状态与微卫星状态的关系

180例患者中159例行基因突变状态检测(MSS/MSI-L 142例,MSI-H 17例)。MSI-H患者发生PIK3CA突变的比例明显高于MSS/MSI-L患者($P<0.05$)。KRAS突变76例,突变率最高,但MSI-H与MSS/MSI-L患者比较差异无统计学意义($P>0.05$)。见表3。

3 讨论

据调查,结直肠癌在全球恶性肿瘤发病中位居第3位,虽然中国人群的发病率低于西方国家,但近30年来亦呈现快速增长趋势。研究发现,微卫星状态与结直肠癌的发展、预后、疗效、遗传等相关,且具有较为特殊的临床病理特征^[2-4]。在微卫星状态的检测中,MSI-H比例为7%~15%^[5,9]。结肠癌中的MSI表型是良好的预后因素,在Ⅱ期患者中表现更为明显。这种存活优势似与MSI肿瘤浸润淋巴细胞有关,提示可能存在更有效的抗肿瘤免疫反应^[10]。本研究中MSI-H比例为10.6%,与上述文献报道相似。在与临床病理特征的关系分析中发现,MSI-H结直肠癌患者的年龄<60岁比例显著高于MSS/MSI-L患者,且其发病部位多集中在右半结肠,而MSS/MSI-L患者则以左半结肠为主。造成此差异的原因可能是由于患者DNA错配修复状态不足。右半结肠癌通常为黏液性,被肿瘤浸润性淋巴细胞密集浸润,并具有激活的MAPK信号,可能由癌前病变发展而来。癌前病变是由与细胞特异性相关的通路驱动的,如对DNA修复缺陷和致癌应激的耐受性通路^[11]。而微卫星不稳定正是由DNA错配修复系统缺陷引起的^[12]。因此MSI-H可能参与了右半结肠癌的发生过程。在分化程度方面,MSI-H患者在低分化的比例较MSS/MSI-L患者明显升高。在TNM分期上,MSI-H患者的分期更早,国内外研究证实了此结论^[13-14],但在本研究中差异无统计学意义($P>0.05$),可能与病例样本量不大有关。

表2 结直肠癌患者外周血T细胞计数与微卫星状态的关系

组别	n	CD3 ⁺ /(个/μL) ^b		CD4 ⁺ /(个/μL) ^b		CD8 ⁺ /(个/μL) ^a		CD4 ⁺ /CD8 ⁺	
		<1 372	≥1 372	<766	≥766	<438	≥438	<1.17	≥1.17
MSS/MSI-L	137	119	18	124	13	101	36	33	104
MSI-H	16	9	7	9	7	8	8	2	14

两组比较:^a $P<0.05$,^b $P<0.01$

表3 结直肠癌患者的基因突变状态与微卫星状态的关系 (例)

特征	MSS/MSI-L (n=142)	MSI-H (n=17)	P值	特征	MSS/MSI-L (n=142)	MSI-H (n=17)	P值
KRAS突变			0.437	TP53突变			0.332
否	73	10		否	127	17	
是	69	7		是	15	0	
NRAS突变			0.599	ERBB2突变			0.367
否	135	16		否	139	16	
是	7	1		是	3	1	
BRAF突变			0.629	AKT1突变			0.289
否	137	16		否	140	16	
是	5	1		是	2	1	
EGFR突变			0.367	MET突变			0.797
否	139	16		否	140	17	
是	3	1		是	2	0	
PIK3CA突变			0.014				
否	122	10					
是	20	7					

细胞免疫与肿瘤的发生、发展密切相关,而T淋巴细胞亚群是人体内细胞免疫最主要的执行者。CD3⁺T细胞的数量代表了机体总的细胞免疫状态;CD4⁺T细胞是辅助性T细胞,参与细胞因子的分泌,辅助其他免疫细胞从而起到调节免疫平衡作用;CD8⁺T细胞是抑制性/细胞毒性T细胞,在抗癌免疫中起着核心作用;CD4⁺/CD8⁺比值的动态平衡对维持机体细胞免疫系统的稳定起到重要作用,当CD4⁺/CD8⁺比值降低,则患者的免疫功能降低,有利于肿瘤的增殖。本研究发现,MSI-H患者的CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺及CD4⁺/CD8⁺T水平均高于MSS/MSI-L患者,其中CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺T细胞水平的差异有统计学意义($P<0.05$ 或 0.01)。MSI-H患者CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺细胞相比MSS/MSI-L患者明显升高,提示MSI-H患者的免疫功能相对更活跃。有研究发现,与MSS相比,MSI-H结直肠癌患者具有更高的肿瘤浸润免疫细胞组成,MSI-H患者辅助性T细胞明显升高,CD8⁺T细胞和活化记忆CD4⁺T细胞有升高的趋势^[15],这与本研究外周血T细胞亚群分布存在一定的相似性。Chirica等^[14]发现,相对于MSS患者,从MSI-H患者肿瘤浸润淋巴细胞中分离出的CD4⁺T细胞的百分比显著降低,CD8⁺T细胞的百分比则显著升高。而CD8⁺T细胞的浸润部分是由MSI引起的^[16]。肿瘤浸润淋巴细胞与外周血T细胞可能存在一定的差异性,仍需更多的研究,并可进一步探究其与微卫星状态的关系。近年来

有研究通过免疫评分评估肿瘤微环境的免疫状态,但需要通过肿瘤浸润淋巴细胞进行评估。而外周血T细胞亚群检测更方便,并可反复进行多次检测。因此如何更好地应用外周血T细胞水平反映肿瘤免疫微环境及指导临床的诊治是我们今后研究的方向。

不同微卫星状态的基因突变比例存在一定差异,本研究中,MSI-H结直肠癌患者PIK3CA突变率显著高于MSS/MSI-L患者($P<0.05$)。PIK3CA是结直肠癌中最常见的突变基因之一,在外显子9和20的解旋酶和激酶结构域中分别约80%的突变热点。研究发现,MSI与外显子9突变呈负相关,与外显子20突变呈正相关^[17],但PIK3CA突变与结直肠癌患者的生存无显著相关^[18]。结肠癌中的MSI表型是良好的预后因素,PIK3CA基因在MSI患者中突变比例升高能否影响患者的预后仍需进一步探讨。本研究中KRAS突变率最高,但MSI-H与MSS/MSI-L患者比较差异无统计学意义($P>0.05$)。BRAF V600E突变是MSI-H转移性结直肠癌患者的不良预后因素^[4]。对于Ⅲ期且行术后辅助化疗的结肠癌患者,BRAF或KRAS突变与MSS患者的预后相关,其复发与生存时间更短^[19]。但在本研究中,BRAF V600E突变MSI-H与MSS/MSI-L患者比较差异无统计学意义($P>0.05$),与Lin等^[20]研究不一致,或与本研究样本量较少有关。

综上所述,结直肠癌患者不同微卫星状态的临床病理特征、外周血T淋巴细胞亚群、基因突变状态都

存在一定的差异性。这些差异性对不同微卫星状态患者的预后可能存在一定的影响。MSI-H患者治疗前的外周血T细胞水平相对MSS/MSI-L患者更高,对于治疗后T细胞水平的变化情况仍需进一步追踪。同时,应用外周血T细胞水平反映肿瘤免疫微环境及指导临床的诊治、疗效与预后判断仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] 郑树, 张苏展, 黄彦钦. 结直肠癌研究30年回顾和现状[J]. 实用肿瘤杂志, 2016, 31(1):2-5.
- [2] COLLURA A, LAGRANGE A, SVRCEK M, et al. Patients with colorectal tumors with microsatellite instability and large deletions in HSP110 T17 have improved response to 5-fluorouracil-based chemotherapy[J]. Gastroenterology, 2014, 146(2):401-411.
- [3] GANDHI J S, GOSWAMI M, SHARMA A, et al. Clinical impact of mismatch repair protein testing on outcome of early staged colorectal carcinomas[J]. J Gastrointest Cancer, 2018, 49(4):406-414.
- [4] GOLDSTEIN J, TRAN B, ENSOR J, et al. Multicenter retrospective analysis of metastatic colorectal cancer (CRC) with high-level microsatellite instability (MSI-H) [J]. Ann Oncol, 2014, 25(5):1032-1038.
- [5] 袁瑛. 结直肠癌及其他相关实体瘤微卫星不稳定性检测中国专家共识[J]. 实用肿瘤杂志, 2019, 34(5):381-389.
- [6] 侯雪飞, 杨铮, 万崇华, 等. 大肠癌患者报告结局、生命质量与基因关系的初步探讨[J]. 广东医科大学学报, 2020, 38(5): 543-546,552.
- [7] 张帆, 邸泰霖, 韩克松. 外周血T淋巴细胞亚群水平对结直肠癌患者术后复发的影响及预测价值分析[J]. 中国内镜杂志, 2020, 26(11):8-14.
- [8] GELSOMINO F, BARBOLINI M, SPALLANZANI A, et al. The evolving role of microsatellite instability in colorectal cancer:A review[J]. Cancer Treat Rev, 2016, 51:19-26.
- [9] 陈美丽, 李琳, 禹立霞, 等. 微卫星状态与术后大肠癌患者的临床及病理特征相关性研究[J]. 中国肿瘤临床, 2018, 45(03):131-136.
- [10] ZANAN A, TAIEB J. Predictive and prognostic value of MSI phenotype in adjuvant colon cancer: Who and how to treat?[J]. Bull Cancer, 2019, 106(2):129-136.
- [11] MISSIAGLIA E, JACOBS B, D'ARIO G, et al. Distal and proximal colon cancers differ in terms of molecular, pathological, and clinical features[J]. Ann Oncol, 2014, 25(10): 1995-2001.
- [12] NOJADEH J N, BEHROUZ SHARIF S, SAKHINIA E. Microsatellite instability in colorectal cancer[J]. Excli J, 2018, 17:159-168.
- [13] 王迪, 宋福林. 微卫星状态与大肠癌术后患者的临床及病理特征相关性分析[J]. 中国医刊, 2020, 55(3):331-333.
- [14] CHIRICA M, LE BOURHIS L, LEHMANN-CHE J, et al. Phenotypic analysis of T cells infiltrating colon cancers: Correlations with oncogenetic status[J]. Oncoimmunology, 2015, 4(8):e1016698.
- [15] NARAYANAN S, KAWAGUCHI T, PENG X, et al. Tumor infiltrating lymphocytes and macrophages improve survival in microsatellite unstable colorectal cancer[J].Sci Rep, 2019, 9(1):13455.
- [16] SUDOYO A W, KURNIAWAN A N, KUSUMO G D, et al. Increased CD8 tumor infiltrating lymphocytes in colorectal cancer microenvironment supports an adaptive immune resistance mechanism of PD-L1 expression[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2019, 20(11):3421-3427.
- [17] JIN J, SHI Y, ZHANG S, et al. PIK3CA mutation and clinicopathological features of colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis[J]. Acta oncologica (Stockholm, Sweden), 2020, 59(1):66-74.
- [18] LI A J, LI H G, TANG E J, et al. PIK3CA and TP53 mutations predict overall survival of stage II/III colorectal cancer patients[J]. World J Gastroenterol, 2018, 24(5):631-640.
- [19] 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.
- [20] LIN E I, TSENG L H, GOCKE C D, et al. Mutational profiling of colorectal cancers with microsatellite instability[J]. Oncotarget, 2015, 6(39):42334-42344.