

## TGFβ2与MSI在结直肠癌中的相关性及其临床病理学意义

张楚悦<sup>1</sup>, 危群<sup>2</sup>, 杨裔坚<sup>1</sup>, 钱程<sup>1</sup>, 付必莽<sup>1</sup>, 谢楠<sup>1</sup>, 魏雷<sup>1</sup>, 李春满<sup>1</sup>, 苏莹珍<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>昆明医科大学第二附属医院肝胆胰外科, 昆明 650032; <sup>2</sup>昆明医科大学第二附属医院病理科, 昆明 650032; <sup>3</sup>昆明学院医学院公共卫生教研室, 昆明 650214

[中图分类号] R602

[文献标志码] A

[DOI]

10.11855/j.issn.0577-7402.2022.04.0367

[声明]

本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文]

张楚悦, 危群, 杨裔坚, 等. TGFβ2与MSI在结直肠癌中的相关性及其临床病理学意义[J]. 解放军医学杂志, 2022, 47(4): 0367-0374.

[收稿日期] 2021-03-06

[录用日期] 2021-08-24

[上线日期] 2022-01-26

**[摘要]** **目的** 探讨结直肠癌(CRC)组织中TGFβ2的表达与微卫星不稳定性(MSI)的相关性, 以及两者与CRC患者临床病理参数的关系。**方法** 收集2019年1月1日—9月30日昆明医科大学第二附属医院收治的184例CRC患者的CRC组织及癌旁组织, 采用多重荧光PCR毛细管电泳法(CE)检测MSI, 免疫组化染色(IHC)检测MMR和TGFβ2蛋白的表达情况。采用Kappa一致性检验分析IHC与CE检测MSI结果的一致性。qRT-PCR检测TGFβ2 mRNA的表达情况。采用秩和检验分析TGFβ2基因突变与MSI的相关性以及TGFβ2 mRNA相对表达量与临床病理参数的关系。**结果** 184例CRC组织样本中, 152例(82.6%, 152/184)为微卫星低度不稳定(MSI-L)/微卫星稳定(MSS), 32例(17.4%, 32/184)为微卫星高度不稳定(MSI-H)。CE与IHC检测MSI的主体结果具有高度一致性, Kappa一致性系数为0.922( $P < 0.001$ )。与MSI-L/MSS相比, MSI-H多发生于无淋巴结转移、TNM分期 I—II期的CRC( $P < 0.05$ )。TGFβ2 mRNA和蛋白在CRC组织中的表达低于癌旁组织( $P < 0.01$ )。TGFβ2基因在MSI-H CRC组织中的突变率高于MSI-L/MSS CRC组织[93.3%(28/30) vs. 14.9%(23/154),  $P < 0.01$ ]。TGFβ2 mRNA相对表达量在MSI-H肿瘤中高于MSI-L/MSS肿瘤( $7.93 \pm 0.36$  vs.  $4.47 \pm 1.31$ ,  $P < 0.01$ ), 在癌旁组织中高于CRC组织( $9.38 \pm 0.82$  vs.  $4.76 \pm 1.63$ ,  $P < 0.01$ )。在无远处转移、无淋巴结转移、TNM分期 I—II期的CRC组织中, TGFβ2 mRNA相对表达量较高( $P < 0.05$ )。**结论** MSI与TGFβ2的表达在肿瘤发生部位、是否发生淋巴结转移及TNM分期方面存在一致性及其协同性。

**[关键词]** 结直肠癌; 转化生长因子β II型受体; 微卫星不稳定; 临床病理参数

### Correlation between TGFβ2 and MSI in colorectal cancer and its clinicopathological significance

Zhang Chu-Yue<sup>1</sup>, Wei Qun<sup>2</sup>, Yang Yi-Jian<sup>1</sup>, Qian Cheng<sup>1</sup>, Fu Bi-Mang<sup>1</sup>, Xie Nan<sup>1</sup>, Wei Lei<sup>1</sup>, Li Chun-Man<sup>1</sup>, Su Ying-Zhen<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, <sup>2</sup>Department of Pathology, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China

<sup>3</sup>Department of Laboratory Medicine and Preventive Medicine, School of Medicine, Kunming University, Kunming 650214, China

\*Corresponding author, E-mail: suyingzhen@163.com

This work was supported by the Yunnan Science and Technology Basic Research Project (202001BA070001-045, 202001AY070001-213), the Yunnan Educational Science Research Fund (2019J0567), and the Technical Talents Introduction Program of Kunming University (YJL18019)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the correlation between the expressions of TGFβ2 and microsatellite instability

**[基金项目]** 云南省科技计划项目(202001BA070001-045, 202001AY070001-213); 云南省教育科学研究基金(2019J0567); 昆明学院引进人才科研项目(YJL18019)

**[作者简介]** 张楚悦, 硕士研究生, 主要从事腹部肿瘤的诊断与治疗研究

**[通信作者]** 苏莹珍, E-mail: suyingzhen@163.com

(MSI) in colorectal cancer (CRC) tissues, and the relationship between the two protein molecules and clinicopathological parameters. **Methods** The CRC and adjacent tissues of 184 patients with CRC pathologically diagnosed in the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University from January 1, 2019 to September 30, 2019 were collected, the expression of MSI was detected by capillary electrophoresis (CE), and the expressions of MMR and TGF $\beta$ R2 proteins were detected by immunohistochemistry (IHC). Kappa consistency test was used to analyze the consistency of IHC and CE MSI results. The relative TGF $\beta$ R2 mRNA expression was detected by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR). Rank sum test was used to analyze the correlation between TGF $\beta$ R2 gene mutation and MSI, and the relationship between TGF $\beta$ R2 mRNA relative expression level and clinicopathological parameters. **Results** Among 184 CRC tissue samples, 152 cases (82.6%, 152/184) were microsatellite instability low-frequency (MSI-L)/microsatellite stability (MSS) and 32 cases (17.4%, 32/184) were microsatellite instability high-frequency (MSI-H). The main results of MSI detected by CE and IHC were highly consistent, and the Kappa consistency coefficient was 0.922 ( $P < 0.001$ ). Compared with MSI-L/MSS, MSI-H mostly occurred in patients with stages I - II colon cancer without lymph node metastasis ( $P < 0.05$ ). The protein and mRNA expression levels of TGF $\beta$ R2 in CRC tissues were higher than those in the adjacent tissues ( $P < 0.01$ ). The mutation rate of TGF $\beta$ R2 gene in MSI-H CRC was higher than that in MSI-L/MSS CRC [93.3%(28/30) vs. 14.9%(23/154),  $P < 0.01$ ]. The relative expression of TGF $\beta$ R2 mRNA in MSI-H group was higher than that in MSI-L/MSS group ( $7.93 \pm 0.36$  vs.  $4.47 \pm 1.31$ ,  $P < 0.01$ ), was higher in para-cancer tissues than in CRC tissues ( $9.38 \pm 0.82$  vs.  $4.76 \pm 1.63$ ,  $P < 0.01$ ). The relative expressions of TGF $\beta$ R2 mRNA in colon, tumors without metastasis, lymph node without metastasis and TNM I - II stages CRC tissues were higher ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The expressions of MSI and TGF $\beta$ R2 are consistent and synergistic in tumor site, lymph node metastasis, and TNM stage.

**[Key words]** colorectal cancer; transforming growth factor  $\beta$  receptor II; microsatellite instability; clinicopathological parameters

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是发生于大肠黏膜上皮和腺体的恶性肿瘤,大多数呈散发性<sup>[1-2]</sup>,仅少数有遗传背景,其中遗传性非息肉病性大肠癌[又称林奇综合征(Lynch syndrome, LS)]占CRC的3%~5%,90%以上的LS和10%~15%的散发性CRC与微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI)有关<sup>[3]</sup>。转化生长因子 $\beta$  II型受体(transforming growth factor  $\beta$  receptor II, TGF $\beta$ R2)基因位于人染色体3p22,含有6个内含子和7个外显子,编码蛋白分子量为70~80 kD,由567个氨基酸组成属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶受体家族<sup>[4]</sup>。TGF $\beta$ R2在CRC中表达缺失或下降可促进肿瘤的发生和发展,且90%以上的TGF $\beta$ R2突变发生在MSI CRC中<sup>[4]</sup>。本研究探讨CRC中TGF $\beta$ R2表达与MSI的关系,分析两者与CRC临床病理参数的相关性,以期获得可用于CRC早期诊断、治疗及病情评价的生物标志物奠定基础,为探寻CRC靶向治疗及免疫检查点治疗的新靶点提供思路。

## 1 资料与方法

**1.1 研究对象** 收集2019年1月1日—9月30日于昆明医科大学第二附属医院接受结直肠癌根治性手术的184例CRC患者的CRC组织(原发病灶组织)及癌旁组织(结肠癌切缘距离肿瘤 $\geq 10$  cm、中高位直肠癌远端切缘距离肿瘤 $\geq 5$  cm、低位直肠癌远端切缘距离肿瘤 $\geq 2$  cm),其中,结肠包括升结肠、横结肠、降结肠和乙状结肠。纳入标准:术前未接受放

疗、化疗等任何治疗;临床资料和组织病理学资料完整。排除标准:合并其他恶性肿瘤;复发性结直肠癌;手术未达到R<sub>0</sub>切除;术中淋巴结清扫不足12个。CRC患者各项病理资料(包括性别、年龄、肿瘤发生部位、肿瘤最大直径、分化程度、淋巴结转移个数、TNM分期、组织病理类型、肿瘤浸润深度、是否有脉管内癌栓、肿瘤有无远处转移)由昆明医科大学第二附属医院病理科提供。病理分期标准按照美国癌症联合委员会(AJCC)/国际抗癌联盟(UICC)结直肠癌TNM分期系统(2017年第八版)确定。本研究经昆明医科大学医学伦理委员会审核。

**1.2 主要试剂及仪器** MLH1(MAB-0838)、MSH2(MAB-0836)、MSH6(MAB-0831)、PMS2(MAB-0656)抗体及羊抗小鼠/兔IgG聚合物二抗购自福州迈新生物技术开发有限公司;兔抗TGF $\beta$ R2抗体(ab270440)购自英国Abcam公司;DNA提取试剂盒(TSP201-200)购自北京擎科生物科技有限公司;反转录试剂盒EntiLink<sup>TM</sup> 1st Strand cDNA Synthesis Kit购自上海翊圣生物科技有限公司;EnTurbo<sup>TM</sup> SYBR Green PCR SuperMix试剂盒购自武汉ELK Biotechnology公司。组织切片处理机购自德国Leica公司;倒置显微镜IX53购自日本Olympus公司;PCR仪购自杭州朗基科学仪器有限公司;StepOne<sup>TM</sup> qRT-PCR仪购自美国Life Technologies公司。

**1.3 免疫组化染色(IHC)检测错配修复(mismatch repair, MMR)蛋白和TGF $\beta$ R2蛋白的表达情况** 取

CRC组织和癌旁组织，加入10%多聚甲醛溶液固定12~24 h，经脱水、透明、石蜡包埋制成石蜡块，切片后脱蜡和复水，EDTA法进行抗原修复，30%过氧化氢室温孵育15 min阻断内源性过氧化物酶；滴加MLH1(1:250)、MSH2(1:250)、MSH6(1:250)、PMS2(1:250)一抗，于37℃恒温箱中孵育1h；滴加即用型羊抗小鼠/兔IgG聚合物二抗，于37℃恒温箱中孵育0.5 h，DAB显色0.5~1 min后复染，中性树脂封片。显微镜下观察MMR蛋白和TGFβ2蛋白的表达情况。MMR蛋白包括MLH1、MSH2、MSH6和PMS2，其中4种MMR蛋白均表达提示为微卫星低度不稳定(microsatellite instability low-frequency, MSI-L)/微卫星稳定(microsatellite stability, MSS)，1种或多种MMR蛋白表达缺失提示为微卫星高度不稳定(microsatellite instability high-frequency, MSI-H)，阳性判定标准参照文献[5]。依据IHC检测结果，将184例CRC患者分为MSI-H组与MSI-L/MSS组，比较两组的临床病理参数。

**1.4 多重荧光PCR毛细管电泳法(CE)检测MSI** 采用动物DNA提取试剂盒(TSP201-200)提取CRC组织和癌旁组织DNA，5'端合成5/6-羟基荧光素(FAM)引物，R引物合成PAGE引物，DNA样品稀释后作为PCR模板，以2×TSINGKE Master Mix (blue)进行扩增，将扩增后的PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳(电压300 V，时间12 min)，获取鉴定胶图，加水稀释至毛细管电泳所需浓度后行毛细管检测，收集数据进行统计分析。

**1.5 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测TGFβ2 mRNA相对表达量** 提取CRC组织和癌旁组织总RNA，按照反转录试剂盒EntiLink™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit说明书步骤合成cDNA，使用EnTurbo™ SYBR Green PCR SuperMix试剂盒进行扩增，每个样品设置3个复孔。反应条件：95℃预变性30s；95℃变性10s，60℃退火20s，72℃延伸20s，共40个循环。以GAPDH为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算TGFβ2 mRNA相对表达量。引物序列如表1所示。

**1.6 IHC与CE检测MSI结果的一致性分析** 采用Kappa一致性检验分析IHC与CE检测MSI结果的一致性。

**1.7 统计学处理** 应用SPSS 26.0软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示，经大样本正态性检验，TGFβ2 mRNA相对表达量不服从正态分布，其与临床病理参数的关系分析采用配对样本非参数秩和检验；TGFβ2 mRNA在MSI-H组和MSI-L/MSS组中的表达分析采用Wilcoxon符号两独立样本秩和检验；TGFβ2 mRNA在CRC组织和癌旁组织中的表达分析采用配对样本非参数秩和检验；计数资料以

表1 qRT-PCR引物序列

Tab.1 Primer sequence of qRT-PCR

| 基因      | 引物序列(5'-3')                    |
|---------|--------------------------------|
| BAT-25  | 正义链: TCGCCTCCAAGAATGTAAGT      |
|         | 反义链: TCTGCATTTTAACTATGGCTC     |
| BAT-26  | 正义链: TGACTACTTTTGACTTCAGCC     |
|         | 反义链: AACCATTCAACATTTTAAACCC    |
| D5S346  | 正义链: ACTCACTCTAGTGATAAAATCGGG  |
|         | 反义链: AGCAGATAAGACAGTATTACTAGTT |
| D17S250 | 正义链: GGAAGAATCAAATAGACAAT      |
|         | 反义链: GCTGGCCATATATATATTAAACCC  |
| D2S123  | 正义链: AAACAGGATGCCTGCCTTTA      |
|         | 反义链: GGACTTTCCACCTATGGGAC      |
| TGFβ2   | 正义链: TGGAAGGACTCATGACCACA      |
|         | 反义链: TTCAGCTCAGGGATGACCTT      |
| GAPDH   | 正义链: CAACATCAACAACACAGAG       |
|         | 反义链: CCGTCTCCGCTCCTCAG         |

TGFβ2. 转化生长因子β II型受体

例(%)表示。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 CRC组织及癌旁组织样本的MSI状态** CE检测结果显示，184例CRC组织样本中，152例(82.6%，152/184)为MSI-L/MSS，表现为只有一个位点不稳定(MSI-L)，或无不稳定位点(MSS)；32例(17.4%，32/184)为MSI-H，表现为两个或多个位点不稳定(图1、表2)。

IHC检测结果显示，4种MMR蛋白阳性反应产物定位于细胞核，为棕黄色或棕褐色颗粒。184例CRC组织样本中，154例(83.7%，154/184)为MSI-L/MSS，表现为4种MMR蛋白均表达；30例(16.3%，30/184)为MSI-H，表现为1种或多种MMR蛋白表达缺失(图1、表2)。

**2.2 CE与IHC检测MSI结果的一致性** Kappa检验结果显示，Kappa一致性系数为0.922( $P<0.001$ )，拒

表2 CE和IHC检测MSI结果的一致性分析

Tab.2 Consistency analysis of MSI results detected by CE and IHC

| IHC  | CE    |           | 合计  |
|------|-------|-----------|-----|
|      | MSI-H | MSI-L/MSS |     |
| dMMR | 29    | 1         | 30  |
| pMMR | 3     | 151       | 154 |
| 合计   | 32    | 152       | 184 |

CE. 多重荧光PCR毛细管电泳法；IHC. 免疫组化染色；MSI. 微卫星不稳定性；MMR. 错配修复；dMMR. 错配修复功能缺陷；pMMR. 错配修复蛋白正常；MSI-H. 微卫星高度不稳定；MSI-L/MSS. 微卫星低度不稳定/微卫星稳定

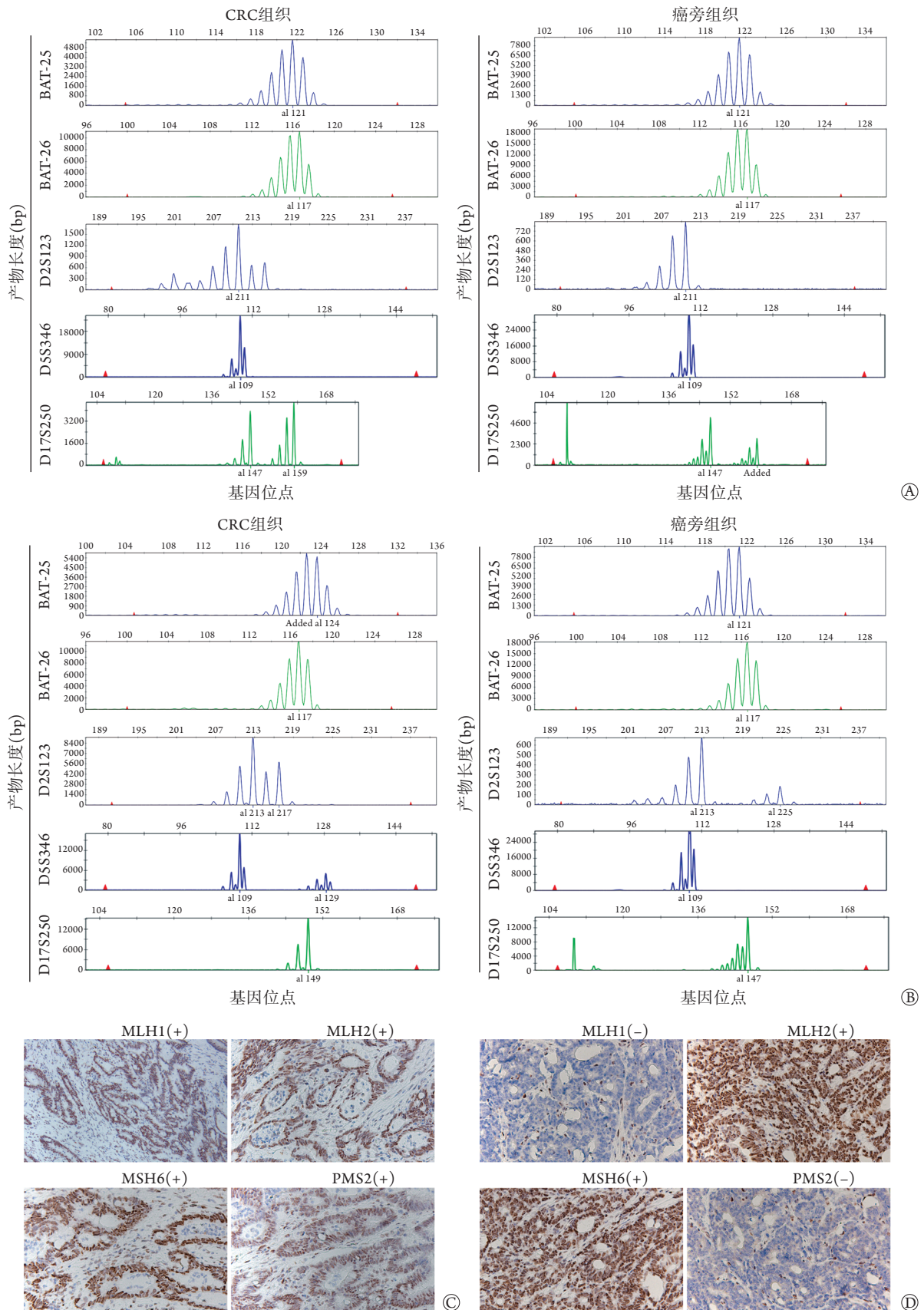


图1 CE与IHC检测CRC组织中MSI的状态

Fig.1 CE and IHC detect MSI status in CRC organization

CE. 多重荧光PCR毛细管电泳法; IHC. 免疫组化染色; CRC. 结肠直肠癌; MSI. 微卫星不稳定性; MSI-L/MSS. 微卫星低度不稳定/微卫星稳定; MSI-H. 微卫星高度不稳定; A. 无微卫星位点突变, 即MSI-L/MSS; B. 4个微卫星位点突变, 即MSI-H; C. MMR蛋白在CRC组织中共表达, 即MSI-L/MSS (IHC  $\times 200$ ); D. MLH1/PMS2在CRC组织中表达共缺失, 即MSI-H (IHC  $\times 200$ )

绝接受零假设, CE与IHC检测MSI的主体结果存在高度一致性(表2)。

**2.3 MSI-H组与MSI-L/MSS组CRC患者临床病理参数比较** 依据IHC检测结果, 将184例CRC患者分为MSI-H组( $n=30$ )与MSI-L/MSS组( $n=154$ ), MSI-H多发生于结肠、无淋巴结转移及TNM分期 I—II 期的CRC, MSI-L/MSS多发生于高、中分化的CRC( $P<0.05$ , 表3)。

表3 MSI-H组与MSI-L/MSS组CRC患者临床病理参数比较[例(%)]

Tab.3 Comparison of clinicopathological parameters of CRC patients between MSI-H group and MSI-L/MSS group [n(%)]

| 项目         | MSI-H组<br>( $n=30$ ) | MSI-L/MSS组<br>( $n=154$ ) | $\chi^2$ | P     |
|------------|----------------------|---------------------------|----------|-------|
| 性别         |                      |                           | 0.346    | 0.556 |
| 男          | 15(50.0)             | 86(55.8)                  |          |       |
| 女          | 15(50.0)             | 68(44.2)                  |          |       |
| 年龄(岁)      |                      |                           | 0.430    | 0.512 |
| <60        | 12(40.0)             | 52(33.8)                  |          |       |
| $\geq 60$  | 18(60.0)             | 102(66.2)                 |          |       |
| 肿瘤部位       |                      |                           | 6.864    | 0.009 |
| 结肠         | 23(76.7)             | 78(50.6)                  |          |       |
| 直肠         | 7(23.3)              | 76(49.4)                  |          |       |
| 肿瘤最大直径(cm) |                      |                           | 1.285    | 0.257 |
| <5         | 16(53.3)             | 99(64.3)                  |          |       |
| $\geq 5$   | 14(46.7)             | 55(35.7)                  |          |       |
| 分化程度       |                      |                           | 11.948   | 0.001 |
| 高、中分化      | 15(50.0)             | 123(79.9)                 |          |       |
| 低分化        | 15(50.0)             | 31(20.1)                  |          |       |
| 淋巴结转移      |                      |                           | 5.049    | 0.025 |
| 阳性         | 7(23.3)              | 70(45.5)                  |          |       |
| 阴性         | 23(76.7)             | 84(54.5)                  |          |       |
| TNM分期      |                      |                           | 4.775    | 0.029 |
| I—II       | 23(76.7)             | 85(55.2)                  |          |       |
| III—IV     | 7(23.3)              | 69(44.8)                  |          |       |
| 组织病理类型     |                      |                           | 1.911    | 0.167 |
| 腺癌         | 21(70.0)             | 125(81.2)                 |          |       |
| 黏液腺癌       | 9(30.0)              | 29(18.8)                  |          |       |
| 肿瘤浸润深度     |                      |                           | 2.690    | 0.101 |
| 未及全层       | 3(7.7)               | 36(18.6)                  |          |       |
| 浸及全层       | 27(92.3)             | 118(81.4)                 |          |       |
| 脉管内癌栓      |                      |                           | 0.283    | 0.595 |
| 有          | 2(6.7)               | 15(9.7)                   |          |       |
| 无          | 28(93.3)             | 139(90.3)                 |          |       |
| 肿瘤远处转移     |                      |                           | 1.115    | 0.291 |
| 有          | 2(6.7)               | 21(13.6)                  |          |       |
| 无          | 28(93.3)             | 133(86.4)                 |          |       |

CRC. 结直肠癌; MSI-H. 微卫星高度不稳定; MSI-L/MSS. 微卫星低度不稳定/微卫星稳定

**2.4 TGF $\beta$ R2蛋白在CRC组织中的表达情况** IHC检测结果显示, TGF $\beta$ R2蛋白阳性反应产物定位于细胞膜和细胞质, 颜色为棕褐或棕黄色, 在细胞膜上呈线状, 在细胞质内呈弥漫状。TGF $\beta$ R2蛋白在CRC组织中低表达或不表达, 阳性表达率为27.7%(51/184); 在癌旁组织中高表达, 阳性表达率为85.9%(158/184), 差异有统计学意义( $P<0.01$ ) (图2)。

**2.5 TGF $\beta$ R2基因突变与MSI的关系** 30例MSI-H CRC组织中, 28例(93.3%, 28/30)TGF $\beta$ R2蛋白表达缺失; 154例MSI-L/MSS CRC组织中, 23例(14.9%, 23/154)TGF $\beta$ R2蛋白表达缺失。TGF $\beta$ R2基因在MSI-H CRC组织中的突变率高于MSI-L/MSS CRC组织( $\chi^2=77.028$ ,  $P<0.01$ )。

**2.6 TGF $\beta$ R2 mRNA在CRC组织中的表达情况** qRT-PCR检测结果显示, MSI-H组TGF $\beta$ R2 mRNA相对表达量高于MSI-L/MSS组, 差异有统计学意义( $7.93 \pm 0.36$  vs.  $4.47 \pm 1.31$ ,  $Z=-4.782$ ,  $P<0.01$ , 图3A); 癌旁组织中TGF $\beta$ R2 mRNA相对表达量高于CRC组织, 差异有统计学意义( $9.38 \pm 0.82$  vs.  $4.76 \pm 1.63$ ,  $Z=-11.763$ ,  $P<0.01$ , 图3B)。

**2.7 TGF $\beta$ R2 mRNA相对表达量与临床病理参数的关系** TGF $\beta$ R2 mRNA相对表达量在无远处转移、无淋巴结转移、TNM分期 I—II 期的CRC组织中较高, 差异有统计学意义( $P<0.05$ , 表4)。

### 3 讨论

微卫星DNA广泛分布于原核及真核生物基因组中, 最主要的特征是突变率非常低, 可作为衡量基因组稳定性的良好标志物。MMR系统出现异常会引起错配修复功能缺陷(deficient mismatch repair, dMMR), 使微卫星的复制错误无法及时纠正并不断积累造成MSI<sup>[6-8]</sup>。由于MSI肿瘤中大量基因突变, 产生了多种新的特异性抗原, 这些新抗原在体内经过加工、提呈和识别激活了免疫系统, 因此MSI肿瘤预后较好<sup>[9]</sup>。研究发现, MSI CRC患者大多表现为TNM分期较早、较少发生淋巴结转移和远处转移, 对化疗药物5-氟尿嘧啶(5-FU)耐受<sup>[10]</sup>, 而对细胞程序性死亡受体1(programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1)抑制剂(如帕博利珠单抗和纳武利尤单抗)敏感, 是CRC预后评估和疗效评价的有效指标<sup>[10-11]</sup>。

TGF $\beta$ 信号通路在肿瘤的发生发展中起着重要作用, TGF $\beta$ 结合TGF $\beta$ R2是该信号通路的起点<sup>[12]</sup>。TGF $\beta$ R2广泛分布于正常细胞和肿瘤细胞表面。有研究发现, TGF $\beta$ R2在肿瘤中表达缺失或下降能促进肿瘤的发生和进展, 提示TGF $\beta$ R2是一种抑

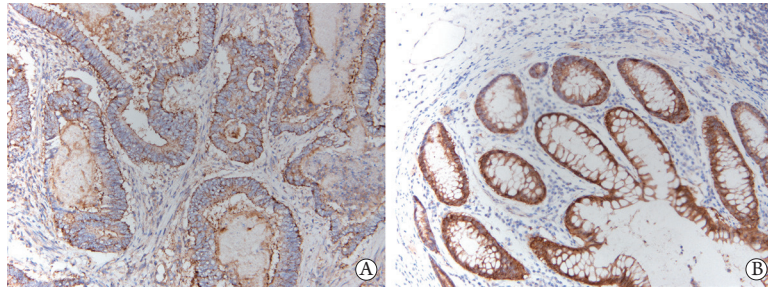


图2 TGFβ2蛋白在CRC组织中的表达情况(IHC × 200)

Fig.2 Expression of TGFβ2 protein in CRC tissues (IHC × 200)

CRC. 结直肠癌; TGFβ2. 转化生长因子β II型受体; IHC. 免疫组化染色; A. TGFβ2蛋白在CRC组织中表达情况; B. TGFβ2蛋白在癌旁组织中表达情况

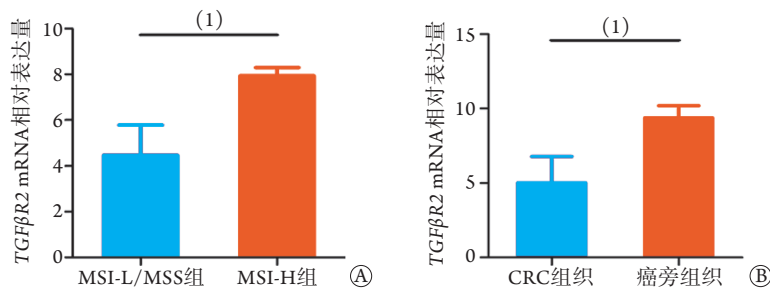


图3 TGFβ2 mRNA在CRC组织中的表达情况

Fig.3 Expression of TGFβ2 mRNA in CRC tissues

MSI-L/MSS. 微卫星低度不稳定/微卫星稳定; MSI-H. 微卫星高度不稳定; TGFβ2. 转化生长因子β II型受体; CRC. 结直肠癌; A. TGFβ2 mRNA在MSI-L/MSS组和MSI-H组中的表达情况; B. TGFβ2 mRNA在CRC组织和癌旁组织中的表达情况; (1)  $P < 0.01$

表4 TGFβ2 mRNA相对表达量与CRC患者临床病理参数的关系( $\bar{x} \pm s$ )

Tab.4 Relationship between TGFβ2 mRNA and clinicopathological parameters of CRC patients ( $\bar{x} \pm s$ )

| 临床病理参数     | 构成 [例(%)] | TGFβ2 mRNA  | Z      | P     |
|------------|-----------|-------------|--------|-------|
| 性别         |           |             | -0.196 | 0.845 |
| 男          | 101(54.9) | 5.10 ± 1.63 |        |       |
| 女          | 83(45.1)  | 4.96 ± 1.91 |        |       |
| 年龄(岁)      |           |             | -0.607 | 0.544 |
| <60        | 64(34.8)  | 4.96 ± 1.91 |        |       |
| ≥60        | 120(65.2) | 5.08 ± 1.68 |        |       |
| 肿瘤部位       |           |             | -6.472 | 0.000 |
| 结肠         | 101(54.9) | 5.76 ± 1.53 |        |       |
| 直肠         | 83(45.1)  | 4.15 ± 1.62 |        |       |
| 肿瘤最大直径(cm) |           |             | -0.849 | 0.396 |
| <5         | 115(62.5) | 4.94 ± 1.68 |        |       |
| ≥5         | 69(37.5)  | 5.20 ± 1.89 |        |       |
| 分化程度       |           |             | -1.653 | 0.098 |
| 高、中分化      | 138(75.0) | 5.11 ± 1.47 |        |       |
| 低分化        | 46(25.0)  | 4.81 ± 2.45 |        |       |
| 淋巴结转移      |           |             | -9.415 | 0.000 |
| 阳性         | 77(41.8)  | 3.67 ± 1.53 |        |       |
| 阴性         | 107(58.2) | 6.02 ± 1.16 |        |       |
| TNM分期      |           |             | -9.290 | 0.000 |
| I - II     | 108(58.7) | 5.99 ± 1.19 |        |       |
| III - IV   | 76(41.3)  | 3.68 ± 1.54 |        |       |

(续表)

| 临床病理参数 | 构成 [例(%)] | TGFβ2 mRNA  | Z      | P     |
|--------|-----------|-------------|--------|-------|
| 组织病理类型 |           |             | -0.002 | 0.999 |
| 腺癌     | 146(79.3) | 5.03 ± 1.70 |        |       |
| 黏液腺癌   | 38(20.7)  | 5.07 ± 1.99 |        |       |
| 肿瘤浸润深度 |           |             | -0.850 | 0.395 |
| 未及全层   | 39(21.2)  | 4.81 ± 1.62 |        |       |
| 浸及全层   | 145(78.8) | 5.10 ± 1.80 |        |       |
| 脉管癌栓   |           |             | -1.642 | 0.101 |
| 有      | 17(9.2)   | 4.38 ± 2.02 |        |       |
| 无      | 167(90.8) | 5.10 ± 1.72 |        |       |
| 远处转移   |           |             | -4.294 | 0.000 |
| 有      | 23(12.5)  | 3.63 ± 1.53 |        |       |
| 无      | 161(87.5) | 5.24 ± 1.70 |        |       |

癌基因, TGFβ2在CRC组织中较正常组织表达下调, 且TGFβ2低表达的CRC患者整体生存率低于TGFβ2高表达的患者<sup>[4]</sup>, 因此, TGFβ2可作为独立的预后因子。Grady等<sup>[13]</sup>对38种CRC细胞株进行研究, 其中11种表现为MSI(其中9种CRC细胞株中TGFβ2表达缺失), 27种表现为MSS(其中3种CRC细胞株中TGFβ2表达缺失), 因此TGFβ2突变与伴有MSI的CRC密切相关。

本研究采用IHC检测184例CRC组织样本发现, dMMR表型有30例, pMMR表型有154例; 采

用CE检测CRC组织样本发现, 30例dMMR表型CRC组织中有29例为MSI-H, 1例为MSI-L/MSS; 154例pMMR表型CRC组织中有3例为MSI-H, 151例为MSI-L/MSS。假设CE检测结果为真, 则IHC检测的敏感度和特异度分别为90.6%和99.3%, 两者准确度的一致性为97.8%; 假设IHC检测结果为真, 则CE检测的敏感度和特异度分别为96.7%和98.1%, 两者准确度的一致性为97.8%。由于IHC的敏感度高于CE, 因此本研究数据以IHC检测结果为准, 即184例CRC样本中, dMMR表型有30例, pMMR表型有154例。通过Kappa检验得出, Kappa一致性系数为0.922( $P < 0.05$ ), 拒绝接受零假设, CE与IHC检测的主体结果存在高度一致性(表2)。两种方法检测的结果差异有统计学意义且一致性为97.8%, 与Shia等<sup>[14]</sup>的研究结果相近。对比分析两种方法检测MSI的结果, 发现IHC的敏感度高于CE, 而特异度相反, 与Karahana等<sup>[15]</sup>的研究结果一致。因此, 使用简便、快捷且经济的IHC检测CRC组织MMR蛋白可作为一种初筛手段, 易于在临床工作中开展。Ashktorab等<sup>[16]</sup>收集1997—2015年15 105例CRC患者进行Meta分析, 结果显示, III期和IV期CRC患者多表现为MSI-H, 本研究结果与之不一致。分析其原因为, 本研究对象为术后CRC患者且大多数TNM分期较早, 而大部分IV期患者接受了放化疗及靶向药物治疗, 接受手术患者较少, 并且Ashktorab等<sup>[16]</sup>的研究起始时间为1997年, 时间偏早且筛查手段和诊断技术受到限制, 大多数患者在治疗时处于晚期。本研究中MSI-H CRC患者多为I—II期, 与MSI-L/MSS组相比, MSI-H组患者较少出现淋巴结转移, 可能与MSI-H引起较强的免疫反应有关, 后者可以协助机体抵抗肿瘤细胞对机体的攻击, 从而抑制肿瘤向淋巴结转移, 最终导致MSI-H肿瘤较MSI-L/MSS肿瘤预后好。本研究中MSI-H CRC多无肿瘤远处转移, 与Ward等<sup>[17]</sup>的研究结果一致, 但由于本研究纳入样本量有限, 所以无明显统计学差异。

TGF $\beta$ 信号通路在肿瘤的发生发展中起着重要作用, TGF $\beta$ 结合TGF $\beta$ R2是该信号通路的起点<sup>[18]</sup>。研究发现, TGF $\beta$ R2为抑癌基因<sup>[4]</sup>。王朝晖等<sup>[19]</sup>发现, 伴有MSI的18例CRC中, 16例发生TGF $\beta$ R2突变, 突变率为88.9%, 与本研究结果一致。本研究运用qRT-PCR分别对MSI-H组和MSI-L/MSS组CRC患者TGF $\beta$ R2 mRNA的表达情况进行检测, 结果显示, 与癌旁组织相比, CRC组织中TGF $\beta$ R2 mRNA相对表达量降低, 分析原因可能与TGF $\beta$ R2阻碍肿瘤细胞的生长、扩散有关, 但其具体作用机制尚未明确。与MSI-H组相比, MSI-L/MSS组中TGF $\beta$ R2

mRNA相对表达量偏低, 这可能与研究样本的差异以及CRC的复杂性有关。MSI和TGF $\beta$ R2的表达与临床病理特征中肿瘤发生部位、淋巴结是否转移、TNM分期和肿瘤有无远处转移有关。MSI-H多发生于结肠, TGF $\beta$ R2在结肠部位的表达量偏高; MSI-H CRC倾向于淋巴结转移阴性, TGF $\beta$ R2在淋巴结无转移的CRC组织中表达量偏高; MSI-H CRC的TNM分期大多为I—II期, TGF $\beta$ R2在I—II期CRC组织中表达偏高, 且两者均与性别、年龄、病理类型及肿瘤浸润深度无关。

本研究存在以下局限性: (1)由于入组患者有限, 研究结果可能存在偏倚; (2)采用CE和IHC检测CRC的MSI状态时未进行相关基因测序分析, 且两种检测结果的对比分析缺乏金标准, 因此得到的数据可能存在偏差; (3)对可疑的LS患者, 未收集其家族史信息, 缺乏完整的家系资料, 影响了本研究分析的深度和广度。

综上所述, MSI-H CRC预后较好可能与TGF $\beta$ R2低表达或缺失有关, TGF $\beta$ R2低表达或缺失与MSI关系密切。基于MSI和TGF $\beta$ R2的分子机制并结合其特点, 对个体化治疗具有指导意义, 或可成为评估CRC生存预后的驱动基因; 通过评价CRC中TGF $\beta$ R2的表达与临床病理特征的关系, 或可寻找到预测CRC患者生存预后的新的生物标志物。

#### 【参考文献】

- [1] Wang SY, Wang Y. Research progress of the action mechanism of lncRNA UCA1 and miRNAs in digestive system tumors[J]. Med J Chin PLA, 2021, 46(12): 1232-1238. [王思宇, 王宇. lncRNA UCA1和miRNAs在消化系统肿瘤中的作用机制研究进展[J]. 解放军医学杂志, 2021, 46(12): 1232-1238.]
- [2] Yuan T, Jiang H, Chen ZQ, et al. Overexpression of hnRNPAB promotes epithelial mesenchymal transformation in colorectal cancer cells and its mechanism[J]. Med J Chin PLA, 2021, 46(8): 743-748. [袁涛, 江航, 陈正权, 等. 过表达hnRNPAB基因对结肠癌细胞上皮-间质转化的影响及其分子机制[J]. 解放军医学杂志, 2021, 46(8): 743-748.]
- [3] Fujiwara I, Yashiro M, Kubo N, et al. Ulcerative colitis-associated colorectal cancer is frequently associated with the microsatellite instability pathway[J]. Dis Colon Rectum, 2008, 51(9): 1387-1394.
- [4] Nambara S, Masuda T, Kobayashi Y, et al. GTF2IRD1 on chromosome 7 is a novel oncogene regulating the tumor-suppressor gene TGF $\beta$ R2 in colorectal cancer[J]. Cancer Sci, 2020, 111(2): 343-355.
- [5] Wang SM, Jiang B, Deng Y, et al. Clinical significance of MLH1/MSH2 for stage II/III sporadic colorectal cancer[J]. World J Gastrointest Oncol, 2019, 11(11): 1065-1080.
- [6] Tian T, Li J, Xue T, et al. Microsatellite instability and its associations with the clinicopathologic characteristics of diffuse large B-cell lymphoma[J]. Cancer Med, 2020, 9(7): 2330-2342.
- [7] Park D, Airi R, Sherman M. Microsatellite instability driven

- metastatic parathyroid carcinoma managed with the anti-PD1 immunotherapy, pembrolizumab[J]. *BMJ Case Rep*, 2020, 13(9): e235293.
- [8] Stinton C, Fraser H, Al-Khudairy L, *et al.* Testing for lynch syndrome in people with endometrial cancer using immunohistochemistry and microsatellite instability-based testing strategies - A systematic review of test accuracy[J]. *Gynecol Oncol*, 2021, 160(1): 148-160.
- [9] Ghidini M, Lampis A, Mirchev MB, *et al.* Immune-based therapies and the role of microsatellite instability in pancreatic cancer[J]. *Genes (Basel)*, 2020, 12(1): 33.
- [10] Yuan Y. Consensus on the detection of microsatellite instability in colorectal cancer and other related solid tumors in China[J]. *J Pract Oncol*, 2019, 34(5): 381-389. [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.]
- [11] Wang QX, Qu CH, Gao YH, *et al.* The degree of microsatellite instability predicts response to PD-1 blockade immunotherapy in mismatch repair-deficient/microsatellite instability-high colorectal cancers[J]. *Exp Hematol Oncol*, 2021, 10(1): 2.
- [12] D'Cruz OJ, Qazi S, Hwang L, *et al.* Impact of targeting transforming growth factor  $\beta$ -2 with antisense OT-101 on the cytokine and chemokine profile in patients with advanced pancreatic cancer[J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 2779-2796.
- [13] Grady WM, Rajput A, Myeroff L, *et al.* Mutation of the type II transforming growth factor beta receptor is coincident with the transformation of human colon adenomas to malignant carcinomas[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(14): 3101-3104.
- [14] Shia J, Ellis NA, Klimstra DS, *et al.* The utility of immunohistochemical detection of DNA mismatch repair gene proteins[J]. *Virchows Archiv*, 2004, 445(5): 431-441.
- [15] Karahan B, Argon A, Yildirim M, *et al.* Relationship between MLH-1, MSH-2, PMS-2, MSH-6 expression and clinicopathological features in colorectal cancer[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(4): 4044-4053.
- [16] Ashktorab H, Ahuja S, Kannan L, *et al.* A meta-analysis of MSI frequency and race in colorectal cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(23): 34546-34557.
- [17] Ward R, Meagher A, Tomlinson I, *et al.* Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer[J]. *Gut*, 2001, 48(6): 821-829.
- [18] Wu Z, Yuan Q, Yang C, *et al.* Downregulation of oncogenic gene TGF $\beta$ R2 by miRNA-107 suppresses non-small cell lung cancer[J]. *Pathol Res Pract*, 2020, 216(1): 152690.
- [19] Wang ZH, Zhang XM, Jiang CM, *et al.* Mutation analysis of transforming growth factor  $\beta$  II receptor gene in colorectal adenoma carcinogenesis[J]. *Canc Res Prev Treat*, 2006, 33(7): 509-511. [王朝晖, 张雪梅, 姜春萌, 等. 转化生长因子 $\beta$  II型受体基因突变在大肠腺瘤癌变过程中的作用[J]. *肿瘤防治研究*, 2006, 33(7): 509-511.]

(责任编辑: 纪方方)