

错配修复蛋白

特性：

错配修复 (Mismatch Repair, MMR) 蛋白是一组细胞核内酶, 存在于所有的增殖细胞内, 参与发生于 DNA 复制过程中碱基错配的修复。这些蛋白形成复合物 (异二聚体) 结合于非正常的 DNA 并启动清除过程。MMR 蛋白的丧失导致增殖细胞中 DNA 复制错误的堆积, 特别是位于短重复核苷酸序列基因组的区域, 这种现象即为所谓的微卫星不稳定性 (MSI), 因此, 细胞中 MMR 蛋白的缺失与微卫星高度不稳定 (MSI-H) 密切相关, 与此相反即是微卫星低度不稳定 (MSI-L) 和微卫星稳定 (MSS)。

人类已经认定的错配修复功能的基因有九个, 其中五种和临床关系密切, 因为在遗传性非息肉病性结直肠癌 (HNPCC, 又称 Lynch 综合征) 中可能发生突变, 其发生频率: MLH1 为 49%、PMS1 为 0.3%、PMS2 为 2%、MSH2 为 38%、MSH6 为 9%。已经确认存在超过三百多种突变方式, 如果个体仅携带一种突变, 则还可表达正常的 MMR 蛋白, 但是如果其等位基因也发生 DNA 损伤 (杂合体丧失), 则蛋白产物不能表达。

MLH1 可与 PMS2、PMS1 或 MLH3 (目前还未检测出突变的另一种 MMR 蛋白) 形成异二聚体复合物, 而 MSH2 与 MSH6 形成异二聚体复合物, 当 MSH2 缺乏时, MSH6 蛋白也同时缺失, 可能是由于蛋白的不稳定造成的。

肿瘤中的表达：

携带 MLH1 或 MSH2 突变的患者一生中罹患结直肠癌的风险超过 70%, 发生子宫内膜癌的风险也会显著增加 (50%), 同时发生胃癌、胆道肿瘤、卵巢癌、泌尿系统肿瘤、脑肿瘤和皮肤皮脂腺肿瘤等疾病的风险也有所增加, 胃肠道外肿瘤的分布在某种程度上依赖于突变的类型。大约 5% 的结直肠癌与胚系突变相关。

约 15% 的 MLH1 蛋白缺失的结直肠癌患者并未发生突变, 而是由于 MLH1 启动子的超甲基化。

在结直肠癌中, 相对于微卫星稳定, 微卫星高度不稳定 (MMR 蛋白缺失) 是独立于分级和分期的指标, 与预后好相关, 微卫星高度不稳定的肿瘤通常会具有活化的上皮内淋巴细胞, 被质疑可能会增加肿瘤细胞的凋亡, 从而干扰肿瘤的细胞生长。这种肿瘤通常更多的是位于右半结肠, 并呈现某些异常的形态特征, 粘液腺癌和髓样癌 (可能会有不准确的命名为低分化腺癌) 是其中的突出特点。

结直肠癌中, MSI-H 和 MSS 的病例对于化疗的反应性是不同的, 但是目前的数据尚有争议。

应用：

与分子生物学技术相比, 利用免疫组化技术分析 MMR 蛋白是一种更加简单和经济的方法, 有助于精确定位受损基因, 更适于在病理科推广。对于年龄小于 55 岁或具有家族遗传史的结直肠癌患者均需检测 MLH1、MSH2 和 MSH6, 在计划化疗前也需要检测。在有些医院中, 由于具有预后意义, 所有的结直肠癌患者均进行上述检测。

检测：

通常使用的具有良好功能的抗体是：

MLH1：小鼠单抗克隆 ES05 和 G168-15；

MSH2：小鼠单抗克隆 FE-11 和 G219-1129；

MSH6：兔单抗克隆 EP49、EPR3945 和 SP93。

MLH1 和 MSH2 免疫组化染色预测微卫星高度不稳定或 MMR 蛋白基因突变的敏感性一般可达到约 90% 左右, 但是对于胚系突变的 MLH1 则降至 74%; 特异性通常可接近 100%, 但是胚系突变的 MLH1 特异性降至 81%。造成上述差异的原因除外分析前 (例如生物学的)、分析中 (例如技术性) 和分析后 (例如解读方面) 等原因, 还可能存在其它多方面的原因。

例如, 肿瘤细胞弱或局部表达通常被认为是具有完好的蛋白, 但是也可能与基因缺陷相关, 因为 MLH1 基因经常会出现错译突变, 虽然其免疫原特性上多多少少还会表现出是完整的蛋白, 却可导致功能活性的丧失。

技术层面造成不当染色的主要原因是恰当的抗原修复, 但是染色困难还可源于使用了陈旧的组织 and 室温保存过久的切片 (后者特别针对 MSH6)。偶尔的细胞质染色目前还不能完全解释, 但是可能会妨碍判读。

MLH1 和 MSH2 在微卫星高度不稳定的肿瘤中所占比例高达 90%, 而在微卫星稳定的肿瘤中基本上从不缺失, 在微卫星低度不稳定的肿瘤中所占比例亦甚少。但是也有研究表明在 MSS 或 MSI-L 的肿瘤中 MMR 蛋白阴性染色, 造成这种结果



的原因目前还未知，但是需要强调的是 MSI-H 分析的敏感性和特异性以及在 HNPCC 患者中 MLH1、MSH2、MSH6 的突变也会少于 100%。

对照组织：

对照组织应该包括来自患者的非肿瘤组织（例如正常的相邻肠道粘膜）。

关于 MLH1

NordiQC 在 2005 年、2010 年和 2014 年一共进行了三轮 MLH1 的质控。绝大多数参加质控的实验室都能够染出抗原高表达的细胞，例如扁桃体生发中心增殖的 B 细胞、阑尾的上皮基底细胞和具有正常 MLH1 表达的结肠腺癌的肿瘤细胞。但是对于低水平表达的细胞，例如套区静止期的 B 细胞、平滑肌细胞和间质细胞，如何用免疫组化方法进行检测无疑是一个挑战，需要仔细地调整实验步骤。对于质控中所使用的 MLH1 阴性表达的肿瘤，其肿瘤细胞是应该不出现细胞核染色的，但是在肿瘤组织内部和周边的正常细胞应该呈现明确的细胞核染色，作为可靠的内部阳性对照这一点至关重要。另外造成不适染色原因是假阳性或信噪比不好，主要表现在 MLH1 不表达的结肠腺癌中出现肿瘤细胞异常的弥漫性细胞核染色和/或额外的影响判读的细胞质和背景染色（见图 1），这些染色方式多见于克隆 G168-15 和 G168-728 的小鼠单抗。

克隆 ES05 的小鼠单抗是最为广泛应用的高通过率抗体，在三种主要的 IHC 检测平台（DAKO、Leica 和 Ventana）上均可获得满意的结果。应用碱性缓冲液进行有效的抗原修复结合使用高敏感性非生物素的检测系统是取得优异结果的前提。

扁桃体被推荐用于对照组织，几乎所有的套区 B 细胞必须至少呈现弱至中等强度的细胞核染色，而生发中心的增殖 B 细胞呈现中等至强的细胞核染色（见图 2）。MLH1 丧失表达的结肠腺癌推荐作为阴性对照，肿瘤细胞应可见细胞核无染色，而间质细胞可见明确的细胞核染色，散在的肿瘤细胞可见微弱的核膜染色（见图 3）

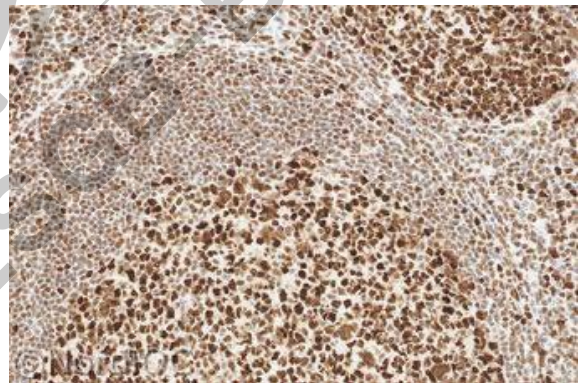
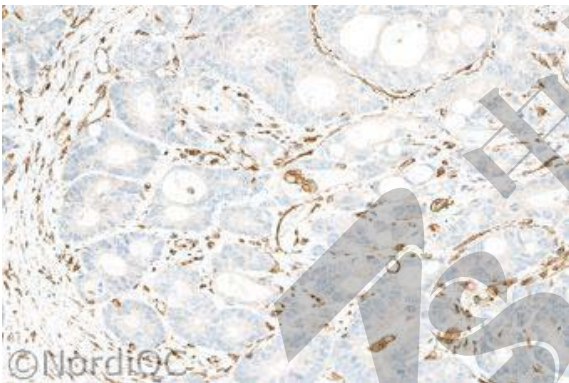


图 1 :MLH1 在 MLH1 丧失表达的结肠腺癌中的非正常表达，尽管肿瘤细胞是阴性表达，但是可见位于巨噬细胞和内皮细胞的异常的细胞质表达，可干扰对于结果的判读，因为不能确定间质细胞的细胞核染色。

图 2 : MLH1 在扁桃体中的正确表达方式。

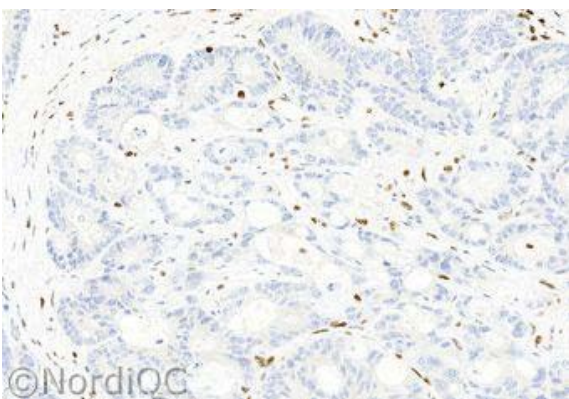


图 3 : MLH1 在 MLH1 丧失表达的结肠腺癌中的正确表达。肿瘤细胞阴性，而淋巴细胞和间质细胞作为内对照呈现明确的细胞核染色。

NordiQC 推荐的抗体，中杉公司目录编号：ZM-0154 克隆：ES05



关于MSH2

NordiQC分别于2005年、2008年和2014年进行了三轮MSH2的质控。所推荐的抗体为克隆FE11和G219-1129（偶尔会出现位于内皮细胞的细胞质染色，如不影响判读可接受）的小鼠单抗。除外克隆选择的因素外，应用碱性修复液进行抗原修复结合使用敏感而特异的二步聚合物检测系统是获得满意结果的关键。

扁桃体被推荐用于作为MSH2的阳性对照，套区B细胞必须呈现至少弱至中等强度的细胞核染色，而增殖的生发中心B细胞呈现中等至强的细胞核染色。MSH2丧失表达的结肠腺癌可作为阴性对照组织，肿瘤细胞无细胞核染色，重要的是肿瘤细胞周围和内部的正常细胞呈现明确的细胞核染色，可作为可靠的阳性对照。

MSH2质控中存在的问题与MLH1相似，需要着重指出的是应用克隆25D12的小鼠单抗的实验室几乎都未能获得优良的结果，无论是使用浓缩液还是即用型抗体，主要存在的问题是细胞核染色过弱，同时在MSH2阴性的结肠癌中出现肿瘤细胞的异常细胞质染色，影响了结果的判读。

关于MSH6

NordiQC分别于2011年和2015年进行了两轮MSH6的质控，优良率从最初的33%提高至63%，除了技术的改进之外，优质抗体的使用也是非常重要的因素。目前NordiQC推荐的抗体包括EP49、EPR3945 和SP93这三个克隆的兔单抗。以往广为使用的克隆为44的小鼠单抗，由于通过率过低，已经不再进行推荐，这株抗体与特异性的细胞核蛋白MSH6亲和性低，且与细胞质蛋白具有交叉反应。如果为了消除细胞质的非特异性染色而采用高的抗体稀释度，则特异性细胞核染色强度会显著下降，变成非常弱的细胞核信号；另一方面，如果联合使用克隆44鼠单抗和高灵敏度的IHC体系，如基于碱性修复液的修复和二步法聚合物检测系统，额外的背景染色和细胞质染色就会严重干扰特异性细胞核染色的判读。

所以，优质的一抗、有效的抗原热修复以及使用敏感性特异性俱佳的二步法聚合物检测系统，是获得优良结果所必不可少的，此外，一抗的稀释度需要同时进行仔细的校准。

扁桃体被推荐用于MSH6的阳性对照组织，套区B细胞必须呈现至少弱至中等强度的细胞核染色，而增殖的生发中心B细胞则呈现中等至强的细胞核染色。MSH6不表达的结肠癌可作为阴性对照，肿瘤细胞无细胞核染色，而间质细胞必须可见细胞核染色，后者可作为内部阳性对照。

NordiQC推荐的抗体，中杉公司目录编号：ZA-0541 克隆：EP49

关于PMS2

2014年NordiQC第一次进行了PMS2的质控，总体通过率明显高于上述三个指标。主要存在的问题也与上述阐述的无异，大多是由于低水平表达的细胞显色过弱或阴性，还有少部分实验室染色的信噪比不好。克隆EP51兔单抗以100%的通过率获得了推荐，并被证实在三大染色平台系统（DAKO、Leica和Ventana）均可使用，此外EPR3947兔单抗也获得了推荐。阳性对照依然是扁桃体作为阳性对照，无PMS2表达的结肠癌作为阴性对照，两种对照的染色方式同上。

NordiQC推荐的抗体，中杉公司目录编号：ZA-0542 克隆：EP51

