

MSI Analysis System

肿瘤微卫星不稳定性检测系统

Promega 公司

普洛麦格公司 (Promega Corporation) 成立于 1978 年，总部设在美国威斯康星州麦迪逊市，在 16 个国家设有分公司，在全球范围内还有 50 多个经销商，服务全球 100 多个国家。普洛麦格公司是为生命科学产业提供创新型解决方案和技术支持的领导者。公司拥有 3,000 多种产品，致力于提高全球范围内的科学家对基因组学、蛋白质组学、细胞分析、分子诊断和遗传鉴定等领域的认知。

普洛麦格产品不仅被生命科学研究者用于对生物学基本问题的理论研究，也被广泛应用于应用科学领域，以帮助诊断、疾病治疗、发现新的治疗方法及应用遗传和 DNA 测试进行人类遗传鉴定。普洛麦格公司在多个重要领域拥有重要知识产权和许可，包括：

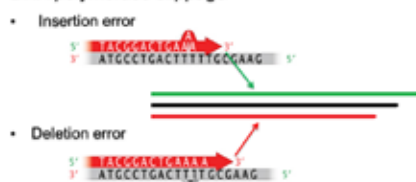
- 生物发光，包括基因工程改造的荧光素酶、荧光素酶载体和底物
- 短串联重复 (STR) 分析用于基于 STR 分析的细胞系鉴定、人类遗传鉴定、细胞和组织鉴定及混合样本检测
- Halo Tag[®] 蛋白标记和捕获技术



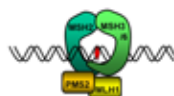
微卫星不稳定性及 DNA 错配修复

微卫星是短串联重复 DNA 序列，长度为 1-6 个碱基对。这些重复序列广泛存在于基因组中，并且由于其基因座位点串联重复次数不同，这些重复序列的长度在不同个体中经常有差异。微卫星标志物可以用于检测微卫星不稳定性（基因组不稳定性的一种）。微卫星不稳定（Microsatellite Instability, MSI）是微卫星等位基因长度的改变，这种改变是由于 DNA 复制过程中重复单元的插入或删除以及 DNA 错配修复系统纠错失败造成的。

DNA polymerase slippage



A. Initiation



B. Excision & resynthesis



DNA 错配修复（DNA mismatch repair system, MMR）是一类能识别并修复 DNA 复制及重组过程中的碱基的错误插入、删除或错配的系统，该修复系统主要包括 4 个蛋白，MLH、MSH2、MSH6 和 PMS2。微卫星对 MMR 易感，MMR 系统正常时呈现微卫星稳定（Microsatellite Stable, MSS），缺失某个 MMR 蛋白功能时导致 MMR 系统缺陷，致微卫星复制错误累积，呈现为微卫星不稳定（MSI）。组织出现 MSI 也即意味着 DNA 错配修复系统（MMR）失活。最新的研究表明：伴随着 MMR 失活的 MSI 表型是临床上一项重要的肿瘤标志物。

MSI Analysis System, Version 1.2

标志物类别	标志物名称	主要重复序列	片段大小范围 (bp) ¹	标记染料 ²	功能说明
单核苷酸标志物	NR-21	(A)21	94–101	JOE	检测 MSI ³
	BAT-26	(A)26	103–115	FL	
	BAT-25	(A)25	114–124	JOE	
	NR-24	(A)24	130–133	TMR	
	MONO-27	(A)27	142–154	JOE	
五核苷酸标志物	Penta C	(AAAAG)3–15	143–194	TMR	识别潜在样本混杂或污染
	Penta D	(AAAAG)2–17	135–201	FL	

1 等位基因大小是用 ABI PRISM® 3100 遗传分析仪、POP-4™ 胶和 36cm 毛细管测定的。大小在表中所列范围之外的罕见等位基因可能存在。当使用不同电泳胶或不同仪器配置时，等位基因大小可能会有变化。

2 TMR = carboxy-tetramethylrhodamine; FL = fluorescein; JOE = 6-carboxy-4', 5'-dichloro-2', 7'-dimethoxyfluorescein

3 微卫星稳定 (MSS): 单核苷酸标志物没有变化; 微卫星低度不稳定 (MSI-L): 单核苷酸标志物有 1 个发生改变; 微卫星高度不稳定 (MSI-H): 单核苷酸标志物 ≥ 两个发生改变

MSI 检测用于筛查林奇综合症

结直肠癌（Colorectal Cancer, CRC）发生的遗传因素包括染色体不稳定性（Chromosome Instability, CIN）和微卫星不稳定性（Microsatellite Instability, MSI）。约 80-85% 的结直肠癌由 CIN 引起，包括家族性腺瘤性息肉病（Familial adenomatous polyposis, FAP）和散发性 CRC（APC、P53、DCC、KRAS 等基因突变）；而另外 15-20% 的 CRC 则主要是由 MSI 引起，包括遗传性非息肉病性结直肠癌（Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer, HNPCC）和散发性 MSI 结直肠癌。

遗传性非息肉病性结直肠癌（HNPCC），又称为林奇综合征（Lynch Syndrome, LS），是一种常染色体显性遗传病，由于 DNA 错配修复（MMR）基因发生胚系突变所致，约占所有结直肠癌的 3-5%。林奇综合症最突出的特点之一是携带者本人或家族成员可发生结直肠癌及其他多种 LS 相关肿瘤，包括子宫内膜癌、卵巢癌、泌尿系肿瘤、胃癌和小肠癌等，其中结直肠癌和子宫内膜癌最为多见。携带者终身患结直肠癌和子宫内膜癌的风险分别为 80% 和 20-60%。而且携带者发生结直肠癌或其他 LS 相关肿瘤的年龄较轻，结肠癌和子宫内膜癌平均诊断年龄分别约为 45 岁和 46 岁，显著早于普通人群。

林奇综合症的筛选对患者本人有非常重要的意义。首先，通过积极的肠镜随访，林奇综合症患者第二原发结直肠癌发病率及死亡率显著降低；其次，林奇综合症携带者发生结直肠癌的时间显著短于散发性 CRC，因此肠镜的复查频率（每 1-2 年一次）要显著高于散发性 CRC 患者；第三，林奇综合症筛查可指导手术方案的制定，例如对林奇综合症患者行预防性全结肠切除或对完成生育后的妇女考虑行预防性的子宫和双附件切除。

同时，林奇综合症的筛选对患者家属成员亦非常重要。确诊林奇综合症能够指导患者家属接受 LS 相关肿瘤的筛查，降低其发病率和死亡率。同时，由于 LS 携带者结直肠癌的发病年龄显著早于普通人群，因此接受肠镜筛查的初次年龄需提前至 20-25 岁。

美国国立综合癌症网络（NCCN）《结直肠癌筛查指南》

➤ 推荐对符合以下任意一条诊断标准的人群进行 LS 筛查：

- 所有结直肠癌患者

或者

- 被确诊为 CRC 时患者年龄 < 70 岁，或患者 ≥ 70 岁但满足 Bethesda 标准的患者。

➤ LS 筛查可以通过以下方案进行

- 微卫星不稳定性（MSI）检测

或

- 免疫组化（IHC），对 4 个错配修复蛋白（MLH1, MSH2, MSH6, PMS2）进行检测，并在 MLH1 蛋白缺失时进行 BRAF 或 MLH1 启动子甲基化检测

- 对于 MSI-H 或 IHC 检测错配修复蛋白缺失并排除 MLH1 启动子甲基化的患者，应进行癌症遗传学咨询并进一步进行检测

林奇综合症筛查方案

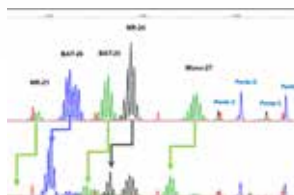
➤ MSI 检测

推荐，有更好的灵敏度

标准化的检测流程，诊断结果客观、易判读

基本不受样本质量、实验操作影响，可重复性好

功能性检测，不能确定突变基因



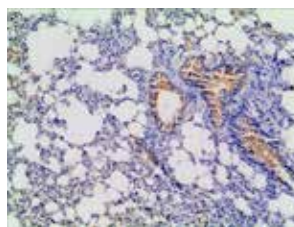
➤ 免疫组化 (IHC) 分析

经典方法学，灵敏度稍低

受样本质量、抗体来源影响大，诊断结果可重复性差

非标准化检测流程，对实验操作有较高要求

可确认突变基因



➤ DNA 测序

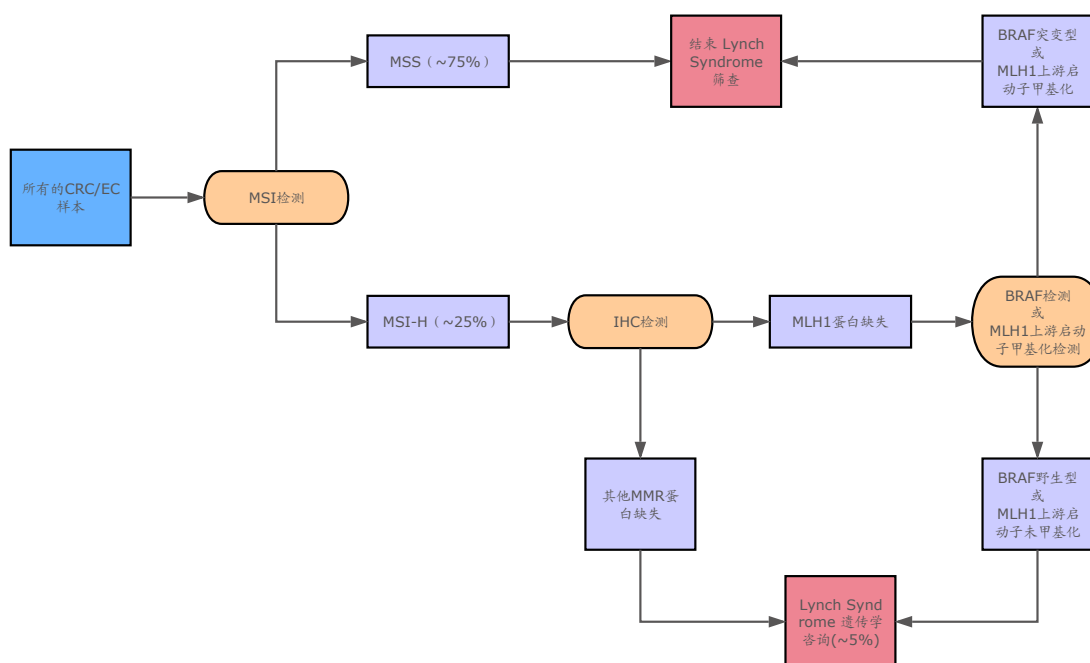
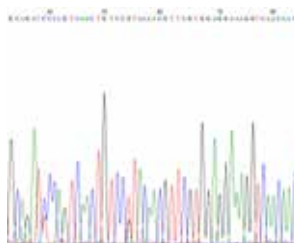
MMR 基因无热点突变，导致数据分析困难

基因突变 / 表型缺乏相关性

遗漏大片的基因缺失

在缺 MSI 或 IHC 信息的情况下，测序结果不可靠

适用于最终确诊，而非筛查

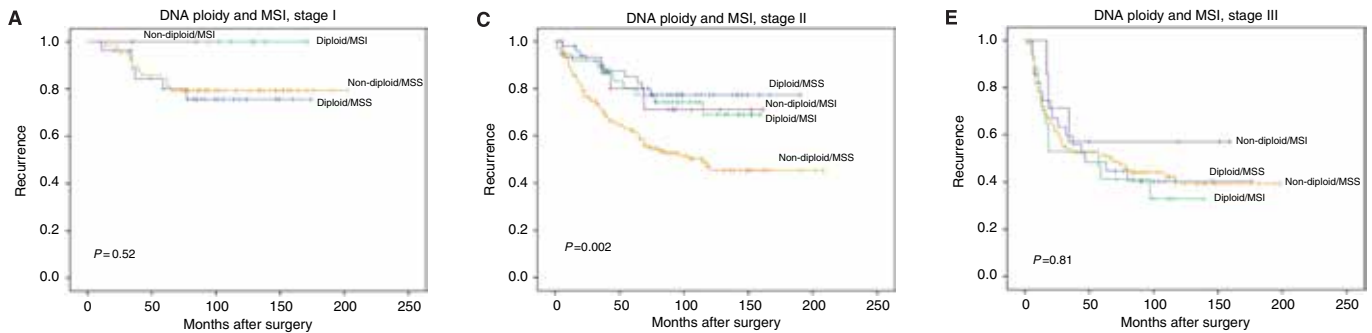


注：筛查林奇综合症需要排除非遗传性的 MSI-H 因素，即：患者 MSI 检测结果为 MSI-H，IHC 检测显示 MLH1 蛋白表达缺失，但 MLH1 蛋白表达缺失的原因 MLH1 上游启动子甲基化，此情况并非由家族性遗传因素引起，应当被排除。BRAF 突变是 MLH1 上游启动子发生甲基化的因素之一，因此使用 MSI + BRAF 联合筛查能够排除大部分 MSI-H 但非林奇综合症的情况。

MSI 检测用于 CRC 患者预后及治疗指导

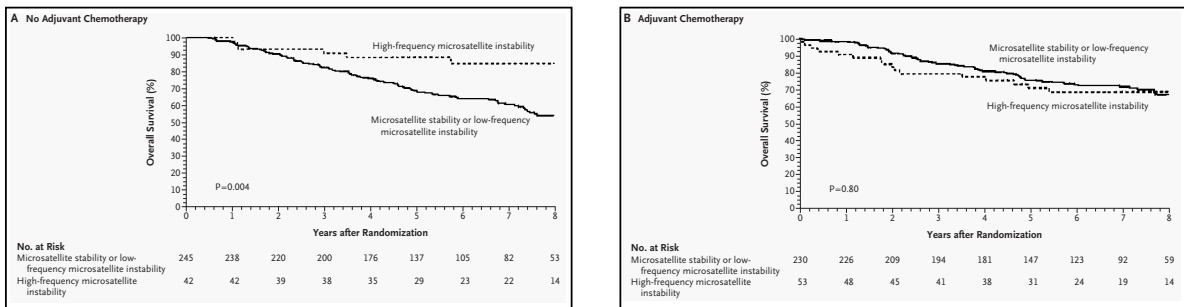
Popat S et al. 在《British Journal of Cancer》杂志上发表的一项纳入了 32 项研究共 7642 例 II 期结直肠癌患者的荟萃分析结果显示，与 MSS 患者相比，MSI-H 患者死亡风险为 0.65 (95%CI, 0.59-0.71)，降低高达 35%¹。目前已有大量证据表明，MSI-H 是 II 期结直肠癌患者预后良好的一个标志物。

I 期 (A)、II 期 (B)、III 期 (E) 癌症的时间-复发率生存分析曲线 (Kaplan-Meier Plot)²



大量证据表明，MSI-H 患者并不能从 5-FU 的辅助化疗中获益，MSI-H 可作为 5-FU 辅助治疗 CRC 无效的预测标志物。Ribic CM et al. 发表在《New England Journal of Medicine》杂志上的文献数据显示：在 II 期结直肠癌患者中，MSI-H 患者接受辅助化疗较未经治疗者并无生存优势，5 年生存率反而显著缩短 (71% vs. 88%)³。这表明：对于 MSI-H 的 II 期患者，给予 5-FU 辅助化疗非但不能带来生存获益，反而对患者不利。因此，II 期 CRC 患者是否需要辅助化疗，需要综合考虑临床高危因素和 MSI 状态。

基于肿瘤微卫星稳定状态的 II / III 期肿瘤总生存率生存分析曲线³



中国结直肠癌诊疗规范 2015

建议有条件者检测组织标本 MMR 或 MSI (微卫星不稳定性)，如为 dMMR (错配修复缺陷) 或 MSI-H (微卫星不稳定)，不推荐氟尿嘧啶类药物的单独辅助化疗。

参考文献:

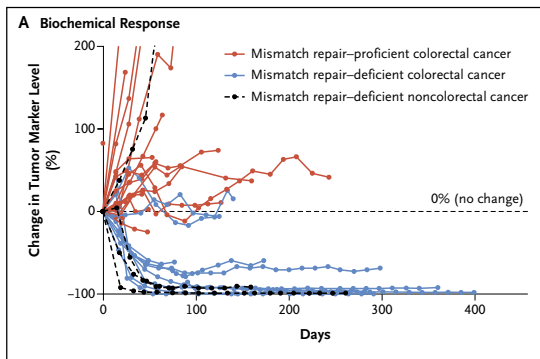
1. Popat S, Hubner R, Houlston R S. Systematic Review of Microsatellite Instability and Colorectal Cancer Prognosis[J]. Journal of Clinical Oncology Official Journal of the American Society of Clinical Oncology, 2005, 23(3):609-618.
2. Hveem T S, Merok MA, Pretorius M E, et al. Prognostic impact of genomic instability in colorectal cancer[J]. British Journal of Cancer, 2014, 110(8):2159-64.
3. Ribic C M, Sargent D J, Moore M J, et al. Tumor Microsatellite-Instability Status as a Predictor of Benefit from Fluorouracil-Based Adjuvant Chemotherapy for Colon Cancer[J]. New England Journal of Medicine, 2003, 349(3):247-257.

MSI 作为 PD-1 抑制剂治疗的生物标志物

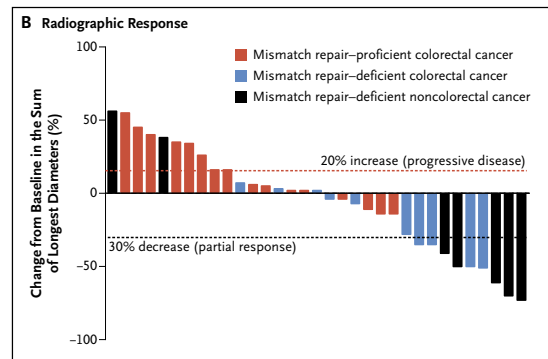
在 2015 年美国临床肿瘤年会 (The ASCO Annual Meeting) 上, 来自约翰霍普金斯医院的 Le et al. 公布了 PD-1 抑制剂治疗肠癌的最新进展——“PD-1 抑制剂在错配修复功能缺陷肿瘤中的研究” (NCT01876511 研究): PD-1 抑制剂对 MSI-H 的 CRC 表现出高缓解率, 并且在其他 MSI-H 晚期肿瘤也对 PD-1 治疗有很好的疗效, 包括子宫内膜癌、胃癌、胆管癌和小肠癌。同日, 著名学术期刊《新英格兰医学杂志》(The NEW England Journal of Medicine) 在线发表了这个研究结果。2017 年 NCCN 临床实践指南更新, 推荐 PD-1 抑制剂药物 Pembrolizumab 和 Nivolumab 用于具有 MSI-H 或 dMMR 分子表型的 mCRC 的治疗。

2017 年 5 月 23 日, 美国 FDA 批准默沙东 (MSD) 旗下的 PD-1 抑制剂药物的 Keytruda (Pembrolizumab) 用于治疗 MSI-H 或 dMMR 的实体瘤患者。这是美国 FDA 批准的首款不依照肿瘤来源, 而是依照生物标志物进行区分的抗肿瘤疗法。

使用 PD-1 抑制剂 Pembrolizumab 治疗的临床反应¹

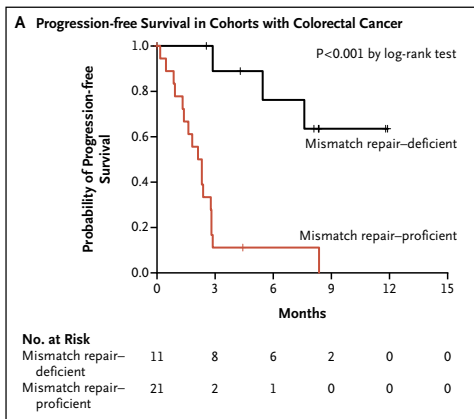


A: 血清生化指标对 Pembrolizumab 治疗的临床反应评价

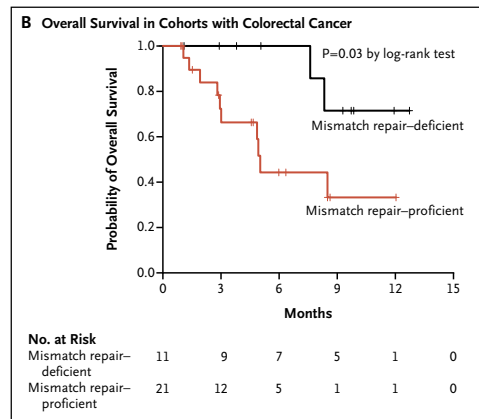


B: 实体瘤治疗疗效评价标准 (RECIST) 对 Pembrolizumab 治疗的临床反应评价。

不同的错配修复系统状态下使用 PD-1 抑制剂 Pembrolizumab 治疗的临床获益¹



A: 结直肠癌患者使用 Pembrolizumab 治疗的无进展生存期



B: 结直肠癌患者使用 Pembrolizumab 治疗的总生存率

参考文献:

1. Le DT, Uram JN, Wang H, et al. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency[J]. N Engl J Med, 2015, 372(26):2509-2520.

MSI 分析工作流程



Maxwell CSC
Instrument



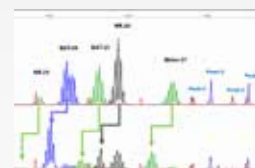
QuantiFluor™
dsDNA System



GeneAmp® PCR
system 9600 / 9700
thermal cyclers



ABI Genetic Analyzer
31XX/37XX/ 3500X



GeneMapper® 4.x
GeneMarker®

产品目录

目录号	产品名	规格	说明
MD1641	MSI Analysis System, Version 1.2	100 reactions (50 reaction pairs)	For Research Use Only
D6001	GoTaq® MDx Hot Start Polymerase	100 U	For Research Use Only
A2351	ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System	10 reactions	For Research Use Only
A2352	ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System	100 reactions	For Research Use Only
AS1450	Maxwell® RSC DNA FFPE Kit	48 preps	For Research Use Only
DG4640	PowerPlex® Matrix Standards, 310	50µl (each dye)	For Research Use Only
DG4800	PowerPlex® 4C Matrix Standard	5 preps	For Research Use Only

订购产品及技术支持请联系:

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司

地址: 北京市东城区北三环东路 36 号环球贸易中心 B 座 907-909 室

电话: 010-58256268 传真: 010-58256160

网址: www.promega.com

