· 专家共识 ·

# 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

中国临床肿瘤学会结直肠癌专家委员会，中国抗癌协会大肠癌专业委员会遗传学组，
中国医师协会结直肠肿瘤专业委员会遗传专委会

**摘要**：微卫星不稳定性（microsatellite instability，MSI）由 DNA 错配修复（mismatch repair，MMR）蛋白功能缺陷导致，这一分子特征在结直肠癌和子宫内膜癌等相关实体瘤中具有重要的临床意义。目前检测 MSI 状态的手段包括免疫组织化学检测 MMR 蛋白、多重荧光聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）检测微卫星位点和基于二代测序（next generation sequencing，NGS）平台的 MSI 算法。本共识针对 MSI 的定义、临床意义及其 3 类检测手段各自的优势与不足展开阐述和推荐。希望专家共识的制订可大力推动恶性肿瘤 MSI 状态普筛工作，提高临床医师对各种检测方法的认识，从而更加准确地解读检测结果，为患者提供更优质的临床服务。

**关键词**：结直肠癌；微卫星不稳定性；免疫组织化学；二代测序
**中图分类号**：R735. 3　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-1692（2019）05-0381-09

## Consensus on detection of microsatellite instability in colorectal cancer and other related solid tumors in China

The Committee of Colorectal Cancer，Chinese Society of Clinical Oncology；
Genetics Group of the Committee of Colorectal Cancer，China Anti-cancer Association；
Genetics Committee of the Committee of Colorectal Cancer，Chinese Medical Doctor Association

**Abstract**：Microsatellite instability（MSI）is caused by the deficiency of DNA mismatch repair（MMR）with an important clinical significance in the related solid tumors，such as colorectal cancer and endometrial cancer. There are several methods to detect MSI status，including immunohistochemistry for MMR protein，multiplex fluorescent polymerase chain reaction（PCR）for microsatellite site and next generation sequencing（NGS）-based MSI algorithm. The consensus elaborates the definition and clinical significance of MSI as well as the advantages and disadvantages of the three detection methods. Through this expert consensus，we hope to promote the broad screening for MSI status of malignancies and improve the acknowledge of clinicians to various testing methods. Thereby，they could interpret the results more accurately and provide better clinical services to patients.

**Key words**：colorectal cancer；microsatellite instability；immunohistochemistry；next generation sequencing

## 1　微卫星不稳定性的定义

微卫星（microsatellite，MS）是指细胞基因组中以少数几个核苷酸（多为 1 ~ 6 个）为单位串联重复的 DNA 序列，又称短串联重复（short tandem repeat，STR）。DNA 错配修复（mismatch repair，MMR）功能出现异常时，微卫星出现的复制错误得不到纠正并不断累积，使得微卫星序列长度或碱基组成发生改变，称为微卫星不稳定性（microsatellite instability，MSI），同时导致基因组呈现高突变表型。肿瘤中，MMR 功能缺陷往往由于 MMR 基因（MLH1、MSH2、MSH6 及 PMS2）及其相关基因 EPCAM 的致病性突变导致，也可能由于 MLH1 启动子区高甲基化引起的 MLH1 表达缺失导致[1]。MSI 现象于 1993 年在结直肠癌中被首次发现[2]。MSI 根据程度可以被分成 3 类：微卫星高度不稳定性（MSI-high，MSI-H）、

**收稿日期**：2019-05-05
**DOI**：10. 13267/j. cnki. syzlzz. 2019. 05. 001
**基金项目**：国家重点研发计划-NCRCC（2017YFC0908200）
* **通信作者**　袁瑛，E-mail：yuanying1999@ zju. edu. cn

微卫星低度不稳定性(MSI-low, MSI-L)、微卫星稳定(microsatellite stability, MSS)[3]。MSI-H 在不同癌种中的发生率存在较大差异。目前已知 MSI-H 发生率较高的实体瘤包括子宫内膜癌(20% ~ 30%)、胃癌(15% ~ 20%)和结直肠癌(12% ~ 15%,其中Ⅳ期结直肠癌 4% ~5%)等[4]。

## 2 MSI 的临床意义

MSI 是 MMR 蛋白功能缺陷导致的结果。MMR 蛋白功能缺陷同时也会导致基因组呈现高突变表型,进而导致肿瘤发生风险增加。目前,MSI 检测被美国国立综合癌症网络(National Comprehensive Cancer Network, NCCN)结直肠癌临床实践指南及中国临床肿瘤学会(Chinese Society of Clinical Oncology, CSCO)结直肠癌诊疗指南推荐用于所有结肠直肠癌(colorectal cancer, CRC)患者[5-7]。MSI 检测对于包括 CRC 和子宫内膜癌(endometrial cancer, EC)在内的多种实体瘤患者均具有重要临床意义。

### 2.1 MSI 检测作为林奇综合征初筛手段

在 2010 年之前,林奇综合征又被称为遗传性非息肉病性结直肠癌(hereditary non-polyposis colorectal cancer, HNPCC)。这是一种常染色体显性遗传性肿瘤综合征,患者结直肠及其他多部位(包括子宫、卵巢、胃、小肠、胰腺、肝胆系统、上尿道、脑和皮肤等)罹患恶性肿瘤的风险显著升高,是最常见的遗传性结直肠癌综合征[8-9]。林奇综合征主要由 MMR 基因(MLH1、MSH2、MSH6 或 PMS2)之一发生杂合性致病性胚系突变所致,或由 EPCAM 基因缺失导致 MSH2 不表达所致[10]。由于 MMR 基因的功能失活性改变,林奇综合征患者往往表现错配修复功能缺陷(deficient mismatch repair, dMMR)和(或)MSI-H 表型。

以往依据阿姆斯特丹标准(Amsterdam criteria)、Bethesda 指南(Bethesda criteria guidelines)等,CRC 及其他相关肿瘤家族史是识别及诊断林奇综合征的主要方法,但此类基于家族史的策略对于鉴别林奇综合征患者的敏感度有限。认识到绝大部分林奇综合征相关肿瘤具有 MSI-H 表型后,分子检测成为识别林奇综合征的另一种策略。部分专家建议采取"选择性"策略来检测肿瘤,即根据个人史、家族史或按好发年龄段确定高危患者进行检测。如中国《子宫内膜癌诊断与治疗指南(第四版)》即指出,对于遗传性子宫内膜癌如林奇综合征的筛查应在 50 岁以前进行,对 <50 岁或有家族史的 EC 患者建议进行基因检测和遗传咨询[11]。而在 CRC 领域,更多专家推荐对所有患者进行林奇综合征普筛即 MMR 蛋白/MSI 检测。这一策略可提高林奇综合征的检测敏感度,且被证实符合成本效益原则[12-14]。《NCCN 结直肠癌临床实践指南 2019V1》和《CSCO 结直肠癌诊疗指南 2018 版》均推荐所有 CRC 患者进行 MMR 蛋白和(或)MSI 检测[5-7]。随着研究数据不断积累[15-16],《NCCN 子宫肿瘤临床实践指南 2019V3》亦推荐所有 EC 患者进行林奇综合征普筛[17]。《遗传性结直肠癌临床诊治和家系管理中国专家共识》(2018)推荐,有条件的医疗单位可对所有 CRC 患者进行肿瘤组织的 4 个 MMR 蛋白免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)或 MSI 检测,以进行林奇综合征的初筛。对于经初筛确定的 dMMR/MSI-H 患者,再考虑林奇综合征相关基因的胚系突变检测,以明确诊断[18]。

需要注意的是,以 MMR 蛋白/MSI 检测作为初筛手段,有可能漏诊部分林奇综合征患者。MMR 蛋白表达及 MSI(基于不同的微卫星位点选择的 DNA 检测)对林奇综合征的检测敏感度分别为 83% 和 77% ~89%,提示即使对所有 CRC 患者进行 MMR 或 MSI 普筛,也可能存在高达 10% 的漏诊率[19]。近期一项泛癌种实体瘤研究显示,约 2% 的 MSI-L 和 0.3% 的 MSS 状态的实体瘤患者是林奇综合征患者,提示基于 DNA 检测的 MSI 初筛可能在多种实体瘤中漏诊林奇综合征[20]。

同时,仅对 CRC/EC 等林奇综合征经典肿瘤进行 MMR/MSI 状态筛查同样可能导致漏诊。一项包含 15 045 例实体瘤患者(包括 CRC 和 EC 在内的 50 余种肿瘤类型)的研究显示,49%(50/103)的林奇综合征患者表现为非 CRC/EC 肿瘤,包括尿路上皮癌、胃癌、小肠癌、前列腺癌、胰腺癌、肾上腺皮质癌、胶质瘤、软组织肉瘤、间皮瘤、黑色素瘤和原发灶不明癌等,证实林奇综合征相关肿瘤谱远大于过去经典研究提示的范围[20]。因而,具有 MSI-H 表型的任何肿瘤,无论其肿瘤类型及家族史,均应进行林奇综合征相关基因胚系突变检测[20]。

随着测序成本的降低,可考虑在临床实践中采用多基因 panel 进行肿瘤易感基因的筛查。这些多基因 panel 包含林奇综合征相关基因及其他肿瘤易感基因。《NCCN 结直肠癌遗传/家族高风险评估指南 2018V1》专家组对于 CRC 或 EC 的患者及其家属,推荐以下 3 种策略之一进行检测:(1)MMR 状态或 MSI 检测;(2)林奇综合征相关基因胚系突变

检测;(3)包括 MMR 及 EPCAM 在内的多基因胚系突变检测。其中,MMR 状态或 MSI 检测作为普筛的基本方法[21]。

### 2.2　MSI 是Ⅱ期结直肠癌预后因子

目前,临床上推荐对高危Ⅱ期 CRC 患者进行术后辅助化疗,定义的高危因素包括 T4、组织学分化差(3/4 级,不包括 MSI-H 者)、淋巴结切除数目 < 12 枚、肿瘤合并肠梗阻或穿孔、手术切缘阳性或可疑阳性、脉管侵犯和神经侵犯。而具有 dMMR/MSI-H 表型的 CRC 虽然往往分化较差,但通常预后较好,被归为低级别腺癌[22]。一项纳入 32 项研究、7 642 例Ⅱ期 CRC 患者的 meta 分析结果显示,与 MSS 患者比较,MSI-H 患者($n$ = 1 277)死亡风险比(hazard ratio, $HR$)为 0.65(95% $CI$:0.59 ~ 0.71),死亡风险降低 35%[22]。目前公认 dMMR/MSI-H 是Ⅱ期 CRC 的独立良好预后因子,对于具有 dMMR/MSI-H 表型的Ⅱ期 CRC 患者,3/4 级分化(低分化)不被认为是高危因素。

### 2.3　MSI 是Ⅱ期结直肠癌辅助化疗疗效预测因子

一项基于多个Ⅲ期临床研究入组患者数据($n$ = 570)的回顾性分析表明,Ⅱ/Ⅲ期 CRC 患者存在 MSI-H 可预测其接受 5-FU 单药辅助化疗无效[23]。一项 meta 分析亦显示,具有 dMMR/MSI-H 表型的Ⅱ/Ⅲ期 CRC 患者不能从 5-FU 单药辅助化疗获益,且Ⅱ期 dMMR/MSI-H 患者接受 5-FU 单药辅助化疗生存期反而缩短($HR$ = 2.95;95% $CI$:1.02 ~ 8.54)[24]。这些数据表明,对于具有 dMMR/MSI-H 表型的Ⅱ期 CRC 患者,给予 5-FU 单药辅助化疗非但不能生存获益,反而对长期生存产生不利影响。因此,Ⅱ期 CRC 患者根治术后是否应接受辅助化疗以及应接受何种药物或方案进行化疗,需要综合考虑临床-病理高危因素以及 MSI 状态。国内外权威指南均明确提出,具有 dMMR/MSI-H 表型的Ⅱ期 CRC 患者预后较好,不建议使用氟尿嘧啶类单药辅助治疗[5-7]。

### 2.4　MSI 是晚期实体瘤免疫治疗疗效预测因子

MSI-H 表型的晚期实体瘤对于免疫检查点抑制剂[如抗程序性死亡受体-1(programmed cell death-1,PD-1)/程序性死亡受体-配体 1(programmed cell death-ligand 1, PD-L1)抗体]治疗往往具有显著疗效。早在 2016 年,欧洲临床肿瘤协会(European Society of Medical Oncology, ESMO)转移性结直肠癌共识指南已提出,MSI 检测对转移性 CRC 患者免疫检查点抑制剂治疗具有强烈的预测价值[25]。进一步研究提示,免疫检查点抑制剂是否受益的关键因素是 MSI-H 与否,与具体癌种无关[26]。基于此,美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)于 2017 年批准抗 PD-1 抗体帕博利珠单抗(pembrolizumab)用于先前治疗后进展、无满意替代治疗方案的 dMMR/MSI-H 晚期/转移性实体瘤患者。另一抗 PD-1 抗体纳武利尤单抗(nivolumab)也分别于 2017 年和 2018 年获批单药及联合低剂量抗细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原(cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4, CTLA-4)抗体伊匹木单抗(ipilimumab)治疗其他后线治疗无效的伴有 dMMR/MSI-H 的晚期/转移性 CRC 患者。目前帕博利珠单抗及纳武利尤单抗在国内均已获批,虽暂无 MSI-H 肿瘤适应证,但随着国内肿瘤领域免疫治疗临床研究的蓬勃开展、免疫检查点抑制剂的陆续上市及适应证拓展,MSI 作为晚期/转移性实体瘤特别是 CRC 患者免疫治疗疗效的预测生物标志物,其检测将变得越来越重要。

## 3　MSI 状态检测方法及其对比

### 3.1　IHC 检测 MMR 蛋白

MSI 多由 MMR 蛋白表达缺失导致的 MMR 功能缺陷所致,故可通过检测 MMR 蛋白缺失来反映 MSI 状态。通过 IHC 检测 MMR 蛋白表达与基于 DNA 分析检测 MSI 状态是评估相同生物学效应的不同检测方法[5-6]。IHC 方法采用分别针对 MLH1、MSH2、MSH6 及 PMS2 的特异性抗体,阳性表达定位于细胞核。如肿瘤样本中 4 个 MMR 蛋白均阳性表达,则为错配修复功能完整(proficient mismatch repair, pMMR);任一 MMR 蛋白缺失即为 dMMR[27]。一般而言,dMMR 相当于 MSI-H 表型,pMMR 相当于 MSI-L/MSS 表型,而 IHC 检测结果还可指引特定 MMR 基因的突变检测。其中要注意 MMR 蛋白 PMS2 和 MSH6 分别与 MLH1 和 MSH2 协同,其表达与否非常依赖与伴侣蛋白的结合情况,即 MLH1 表达缺失通常伴有 PMS2 表达缺失,而 MSH2 表达缺失通常伴有 MSH6 表达缺失。由于 IHC 方法学的简易性及可行性,《遗传性结直肠癌临床诊治和家系管理中国专家共识》(2018)指出,基于肿瘤组织样本的 IHC 检测为目前我国临床 MMR/MSI 检测的基本推荐[18]。病理学 IHC 检测应强调标本处理的规范,采用机器(自动化)方法与人工判读相结合,并需有良好的质控和内参,其中主要是人工判读部分容易存在问题。鉴于目前国内尚无统一权威标

准,本共识建议病理医师采取美国病理学家协会(the College of American Pathologists, CAP)标准判断 MMR 蛋白表达是否缺失:即存在任何确定的肿瘤细胞核染色判定为 MMR 表达阳性,只有肿瘤细胞核完全不表达才能判定阴性。《结直肠癌分子生物标志物检测专家共识》(2018)对 MMR 蛋白的 IHC 检测报告规范进行了明确阐述[28]。

### 3.2 多重荧光 PCR 毛细管电泳法检测 MSI

直接检测 MSI 状态的常用方法是多重荧光 PCR 毛细管电泳法,这也是当前公认的 MSI 检测"金标准"。当前市面上存在多个基于 PCR 平台的 MSI 检测商用试剂盒,但国内此类试剂盒尚未获得国家药品监督管理局(National Medical Products Administration, NMPA)批准。此类试剂盒设计原理均基于美国国立癌症研究所(National Cancer Institute, NCI)建议的 MS 位点[并进行微调和(或)扩展],将肿瘤细胞与正常细胞的 PCR 法检测结果进行比较,以确定肿瘤细胞的 MSI 状态(有关 PCR 法检测 MS 位点及其判读的介绍详见附录 1)[29-38]。

《CSCO 结直肠癌诊疗指南 2018 版》建议采用 NCI 推荐的 5 个 MS 位点(BAT-25、BAT-26、D2S123、D5S346 和 D17S250)进行 MSI 检测[7]。《遗传性结直肠癌临床诊治和家系管理中国专家共识》(2018)指出,基于肿瘤组织样本的 MSI 检测作为可选推荐,建议在有条件的医疗单位开展[18]。

### 3.3 二代测序(next generation sequencing, NGS)检测 MSI

近年来,随着高通量测序平台的广泛应用,NGS 平台目标区域测序(即 NGS panel)或全外显子组测序(whole exon sequencing, WES)/全基因组测序(whole genome sequencing, WGS)开始应用于 MSI 检测,使用计算工具同时研究基因组上的大量微卫星序列成为可能(当前主流 NGS-MSI 算法原理详见附录 2)。2018 年 ESMO 年会上,ESMO 精准医学工作组(ESMO Precision Medicine Working Group)推荐将 NGS 作为 MSI 的二线检测方法(second line testing)[27]。NCCN 结直肠癌临床实践指南亦指出,MSI 检测可通过经验证的 NGS panel 进行,尤其是对于那些需要同时检测 RAS/BRAF 突变状态的转移性 CRC 患者[5-6]。

已报道的基于 NGS 平台的 MSI 算法包括但不限于 MSIsensor、mSINGS、MANTIS、MSI-ColonCore 和 MSI-FOne 等。其中,基于泛癌种甲醛固定石蜡包埋(formalin fixation and paraffin embedding, FFPE)样本检测的 FoundationOne CDx 及 MSK-IMPACT NGS panel 检测分析产品已获美国 FDA 批准,两者均包含 MSI 检测算法(表 1)。一项来自中国的研究显示,基于 NGS 的 MSI(MSI-ColonCore)检测结果与传统 PCR 方法比较的吻合度高达 99%,与经双重确认的 IHC 检测结果吻合度为 92.4%[33]。采用目标区域 NGS 对肿瘤组织进行 MSI 检测,可同时提供该 panel 包含的大量额外信息,如肿瘤突变负荷(tumor mutational burden, TMB)、MMR 基因胚系突变(林奇综合征确诊)及肿瘤体细胞突变状态等。一项包含泛癌种实体瘤的大样本研究提示,基于 MSIsensor 算法,MSK-IMPACT panel 较传统 PCR 检测敏感度更高,如在一些 IHC-dMMR 的罕见癌种(包括原发灶不明癌、鳞状细胞癌和前列腺癌)中,NGS 判读 MSI-H,而 PCR 判读 MSI-L。推测与目标区域 NGS 检测可同时扫描数以百计的微卫星位点、可进行更加全面的微卫星不稳定性评估相关[34]。

此外,基于外周血循环肿瘤 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)的 MSI(MSI from blood ctDNA, b-MSI)-NGS 算法亦已崭露头角,为肿瘤组织取样困难或不足的晚期实体瘤患者 MSI 检测提供新选择。多个血检 NGS panel 及其各自 bMSI-NGS 算法数据已经开始在国际学术会议上以摘要形式陆续披露(表 2)[39-41],但尚未在学术期刊上以全文形式发表。

**表 1** 基于 NGS 平台的 MSI 算法

**Table 1** The NGS-based MSI algorithms

| 算法 | 采用该算法评估 MSI 的 NGS panel | 准确性(%)* | 敏感度(%) | 特异度(%) | 是否需要正常组织对照 | 参考文献(PMID) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| MSIsensor | MSK-IMPACT | 95.4 | 95.8 | 93.9 | 是 | 30211344[34],24371154[35] |
| mSINGS | – | 98.2 | 97.8 | 98.4 | 否 | 24987110[36] |
| MANTIS | – | 98.9 | 97.2 | 99.7 | 是 | 27980218[37] |
| MSI-FOne | FoundationOne CDx | 99.0 | 95.0~99.0 | 99.0 | 否 | 28420421[38] |
| MSI-ColonCore | 凯康 | 98.7 | 97.4 | 100.0 | 否 | 29277635[33] |

注 * 与 PCR 金标准比较;MSI:微卫星不稳定(microsatellite instability);NGS:二代测序(next generation sequencing);PMID:PubMed 唯一标识码(PubMed unique identifier)

因此,b-MSI-NGS 检测在当前不应常规推荐,仅作为缺乏组织的患者为明确 MSI 状态的一种替代手段。

### 3.4　不同检测方法的比较

3.4.1　IHC 法与 PCR 法比较　既往研究结果显示,IHC-MMR 与 PCR-MSI 检测结果吻合率可高达 90% 以上[42]。同时也应注意到,高度的吻合率需建立在可靠、经认证的检测平台(尤其是 IHC 判读)基础上[43]。IHC 检测的优势是可以直接鉴定出导致 MSI-H 发生的 MMR 缺陷基因。但是,IHC 判读对病理医师要求较高,临床实践中可能出现将蛋白表达错判为缺失的情况。文献复习亦支持,PCR 法行 MSI 检测的假阳性低于 IHC 法,这可能源于 IHC 判读为定性结果且不同实验室之间存在差异[44]。此外,某些 MMR 基因错义突变导致 MMR 蛋白功能缺陷却保留其抗原性。约 10% MMR 功能缺陷的 CRC 患者 IHC 结果显示为阴性(蛋白表达正常),而多重荧光 PCR-MSI 检测正好可以弥补这一不足[44-45]。

3.4.2　NGS 与 PCR 法比较　与传统的 PCR 毛细管电泳方法比较,基于 NGS 的 MSI 检测具有明显的临床应用优势:(1)由于 MSI-H 在实体瘤中普遍占比较低,对于多数实体瘤患者,单独进行 MSI 检测的成本-效益比过低,而基于 NGS 的 MSI 检测可同时捕获多段基因组序列,利用其中已有(或额外增加)的微卫星位点,可在对肿瘤进行基因分型、检测可靶向驱动变异(覆盖编码区域在 >1.0 Mb 的大 panel 还可同时进行 TMB 评估)的同时,同步完成 MSI 状态评估,极大提高分子诊断效率,有利于降低样本用量[46];(2)NGS panel 可覆盖的微卫星位点高达数十至上千个,远多于传统 PCR 检测方法的 5 ~ 7 个位点,有望增加非 CRC 样本检测敏感度[34,36];(3)多数 NGS-MSI 算法采用正常人长度分布模型,无需额外准备正常组织作为对照,这对于临床基因检测实验室优势巨大[46]。

但另一方面,NGS-MSI 检测也存在一定的挑战:(1)识别有良好区分性的微卫星位点需要优良的算法和大量样本验证;(2)重复序列捕获和测序的难度要比一般序列更高,且极易受到实验环节各种因素的影响,故在建库流程、测序参数调校和生物信息学分析等方面都更加复杂精细。

## 4　MSI 检测专家共识

**推荐意见 1:所有结直肠癌患者均应进行 MSI 状态筛查**

越来越多的数据提示,不论家族史还是发病年龄,对 CRC 患者进行林奇综合征的普筛有助于发现更多的林奇综合征患者,特别是在现代社会较小的家庭规模和Ⅱ型林奇综合征家系(发生肠内及肠外肿瘤)的背景下。其次,对于Ⅱ期患者,MSI 状态直接决定其术后复发风险及辅助治疗的临床决策。而对于Ⅲ期患者,虽然证据级别相对较低,但大量数据亦提示,5-FU 单药辅助化疗并不能给患者带来额外获益,故 MSI 状态对于那些无法耐受含铂方案辅助化疗的患者,亦具有重要的参考价值。此外,对于Ⅳ期后线 CRC 患者,MSI 状态有助于筛查免疫检查点抑制剂治疗的适用人群。鉴于 MMR/MSI 状态对于不同分期的 CRC 患者均具有较明确的临床意义,专家组推荐,对所有明确诊断为 CRC 的患者,均应考虑进行 MMR/MSI 状态的普筛。

**表 2**　MSI 状态检测方法学比较

**Table 2**　The comparison of detection methods for MSI status

| 比较内容 | MMR | MSI | MSI | b-MSI[39-40] |
|---|---|---|---|---|
| 方法学 | IHC | PCR | NGS | 液体活检 + NGS |
| 样本类型 | 组织(肿瘤) | 组织(肿瘤 + 癌旁) | 组织(肿瘤) | 外周血 |
| 取样难度 | 较低 | 高 | 较高 | 低 |
| 样本质量要求 | 较低 | 肿瘤占比≥ 20% | 肿瘤占比≥10% | ctDNA $AF_{max}$ ≥0.1% |
| 准确性 | 对病理医师要求较高,可能误判 | 金标准 | 高 | 敏感度较低(88% ~ 94%;对 $AF_{max}$ 有不同要求) |
| 检测覆盖内容 | MMR 蛋白表达情况 | MSI 状态 | MSI、TMB(panel 足够大时)以及多基因(包括 MMR)胚系/体细胞突变状态 | b-MSI、b-TMB(panel 足够大时)以及多基因(包括 MMR)胚系/体细胞突变状态 |

注　MMR:错配修复(mismatch repair);MSI:微卫星不稳定(microsatellite instability);b-MSI:基于外周血循环肿瘤 DNA 的 MSI(MSI from blood circulating tumor DNA);IHC:免疫组织化学(immunohistochemistry);NGS:二代测序(next generation sequencing);ctDNA:外周血循环肿瘤 DNA(circulating tumor DNA);$AF_{max}$:最大等位基因频率(max allele frequency);TMB:肿瘤突变负荷(tumor mutational burden)

**推荐意见 2:晚期实体瘤患者(如胃癌、小肠癌、子宫内膜癌、尿路上皮癌、胰腺癌和胆管癌等)如考虑免疫治疗应行 MSI 状态检测**

除 CRC 外,MSI-H 表型还存在于多种实体瘤,包括胃癌、小肠癌、子宫内膜癌、尿路上皮癌、胰腺癌和胆管癌等。随着国内抗肿瘤免疫治疗临床研究的蓬勃开展及大量免疫检查点抑制剂的陆续上市,MSI 作为晚期肿瘤免疫治疗疗效预测因子的作用日益凸显。而且目前来看,晚期肿瘤患者 TMB 检测并不能替代 MSI 检测。基于此,专家组推荐,对胃癌、小肠癌、子宫内膜癌、尿路上皮癌、胰腺癌和胆管癌等晚期后线的实体瘤患者,经标准治疗失败后,如考虑跨适应证采用免疫检查点抑制剂治疗,均应进行 MMR/MSI 检测,且不应以 TMB 替代 MSI 检测结果。

**推荐意见 3:MSI 检测方法包括经认证的 IHC、PCR 和 NGS 方法(3 种方法各有优势)**

(1)IHC 的前处理务必遵循病理科相关规范,结果判断应由有经验的病理医师完成或进行双人复核,以尽可能避免个人主观造成偏倚。IHC-MMR 与 PCR-MSI 检测结果的高度吻合率建立在可靠、经认证的检测平台(尤其是 IHC 判读)基础上。IHC 判读识别 dMMR 对病理医师要求较高,临床实践中有可能出现将阳性表达错判为缺失的情况,此类误判将直接影响临床医师对患者的预后判断及治疗方案选择。基于此,专家组推荐,IHC 的预处理务必遵循病理科相关规范,判读标准务必统一,推荐借鉴美国 CAP 标准,由不同病理医师进行双盲复核,尽可能避免因个人主观因素造成的判读偏倚。

(2)所有基于 NGS 的 MSI 检测应用于临床前必须进行充分的可靠性认证及临床验证。NCCN 指南推荐,MMR/MSI 检测仅可在临床实验室改进修正案(Clinical Laboratory Improvement Amendments, CLIA)认证的临床实验室进行。由于国内尚无类似的第三方实验室资质认证体系,评估第三方实验室可参考 CLIA 或其他类似资质认证体系。基于这一现状,专家组推荐所有基于 NGS(采用组织或 ctDNA 样本)的 MSI 检测平台在应用于临床前,必须进行充分的可靠性认证及临床验证。强烈建议所有 MSI 检测报告中应同步报告与 MSI 检测准确性最为相关的质量控制信息,例如肿瘤细胞占比/血检中最大等位基因频率(max allele frequency, $AF_{max}$)和 NGS 检测测序深度等,且相关质控信息均应有相应的实验可靠性认证。对于样本不满足质控标准的情形,应在报告中明确指出检测具有局限性。同时呼吁建立国内统一的 NGS 实验室资质认证体系。

(3)3 种方法各自的优缺点。IHC 法可以直接鉴定出导致 MSI-H 发生的 MMR 缺陷基因。IHC 法检测 MMR 蛋白表达可在多数医院的病理科完成,普及性强,且价格低廉。但该方法受判读人员的主观影响较大,存在一定的假阳性与假阴性。

基于样本微切割的多重荧光 PCR 毛细管电泳法,简便且便宜,敏感度和特异度均较好(特别是在经广泛验证的 CRC 肿瘤样本中),但全国能开展该项检测的病理科相对较少,且存在一定的假阴性。

对于需要同时检测肿瘤驱动基因和(或)治疗相关基因变异的患者,目标区域 NGS 是个不错的选择。NGS 法可同时检测 panel 覆盖的驱动基因变异,包括 MMR 基因胚系和(或)体细胞突变,甚至 TMB 等分子标签。基于 ctDNA 样本的 b-MSI 检测目前正处于验证阶段,有望为肿瘤组织取样困难或不足的晚期肿瘤患者提供新的选择。但 NGS 单独用于 MSI 检测则不推荐,理由是增加经济负担和浪费资源。

如果遇到患者同时进行 IHC-MMR 蛋白表达和 DNA 分析(PCR 或 NGS 法)MSI 状态检测且检测结果不一致的情况,可考虑采用第 3 种方法(NGS 或 PCR 法)进行验证(部分专家推荐)。

**顾问**　郑树(浙江大学医学院附属第二医院肿瘤外科)、蔡三军(复旦大学附属肿瘤医院大肠外科)、张苏展(浙江大学医学院附属第二医院肿瘤外科)

**专家组组长**　袁瑛(浙江大学医学院附属第二医院肿瘤内科)

**专家组成员(按姓名拼音排序)**　陈功(中山大学附属肿瘤医院结直肠外科)、陈志康(中南大学湘雅医院普外胃肠外科)、丁克峰(浙江大学医学院附属第二医院肿瘤外科)、董坚(云南省肿瘤医院结直肠外科)、姜小清(第二军医大学东方肝胆外科医院胆道一科)、鞠海星(浙江省肿瘤医院结直肠肿瘤外科)、来茂德(中国药科大学基础医学)、李君(浙江大学医学院附属第一医院病理科)、林洁(南方医科大学南方医院病理科)、林天歆(中山大学孙逸仙纪念医院泌尿外科)、刘方奇(复旦大学附属肿瘤医院大肠外科)、刘涛(郑州大学第一附属医院胃肠外科)、刘艳辉(广东省人民医院病理科)、楼文晖(复旦大学附属中山医院普外科)、陆舜(上海市胸科医院肿瘤科)、彭亦凡(北京大学肿瘤医院结直肠外科)、邱红(华中科技大学同济医学院附属同济医院肿瘤内

科)、任黎(复旦大学附属中山医院普外科)、盛剑秋(解放军总医院第七医学中心消化内科)、孙亚红(山东省医学科学院附属医院肿瘤内科)、王琳(南京八一医院肿瘤内科)、王自强(四川大学华西医院胃肠外科)、吴小华(复旦大学附属肿瘤医院肿瘤妇科)、熊斌(武汉大学中南医院胃肠外科)、徐栋(浙江大学医学院附属第二医院肿瘤外科)、徐烨(复旦大学附属肿瘤医院大肠外科)、许晶虹(浙江大学医学院附属第二医院病理科)、薛卫成(北京大学肿瘤医院病理科)、杨春康(福建省肿瘤医院胃肠肿瘤外科)、殷先利(湖南省肿瘤医院消化泌尿内科)、张俊(上海交通大学医学院附属瑞金医院肿瘤科)、张卫(上海长海医院肛肠外科)、曾珊(中南大学湘雅医院肿瘤科)、宗红(郑州大学第一附属医院肿瘤内科)

**附录1:PCR方法的微卫星位点选择**

基于PCR方法的微卫星位点选择曾经历数次重大变迁。1998年NCI推荐用于检测微卫星状态的5个微卫星位点,包括2个单核苷酸重复位点(BAT-25和BAT-26)以及3个双核苷酸重复位点(D2S123、D5S346和D17S250);判读标准为:≥2个微卫星位点不稳定为MSI-H,1个位点不稳定为MSI-L,所有位点均稳定即为MSS[29,47]。至2002年修订为Pentaplex panel,包含5个单核苷酸重复位点BAT-25、BAT-26、NR21、NR24和NR27,以提高检测敏感度及特异度[48]。2006年,MSI分析系统Promega以Mono-27取代NR27,并增加Penta C和D用于样本识别,进一步提高MSI检测敏感度[49]。在此基础上,一系列基于PCR技术的MSI检测商用试剂盒问世,并进一步增加特异性位点以实现产品差异化,其判读标准亦随位点数目变化而发生改变,如以≥30%或≥40%的微卫星位点不稳定作为MSI-H的判定标准。

**附录2:当前主流NGS-MSI算法原理**

基于NGS的MSI检测原理分为以微卫星位点重复序列长度变化为基础以及以突变负荷和突变类型为基础。其中,基于NGS目标区域测序(targeted gene sequencing, TGS)的检测技术通常基于前者进行MSI检测。此类MSI检测的技术核心包括选取最有效的微卫星标志位点组合以及构建合理的分类模型用以最大程度区分MSI-H和MSS状态下微卫星位点重复单元长度变化水平的差异,使得MSI检测敏感度和特异度达到最优,并保证在低肿瘤占比样本中检测的稳健性。

标志位点通常表现为在MSS状态下重复单元长度高度稳定,而MSI-H状态下高频不稳定,以保证MSI检测的最优敏感度和特异度。基于WGS和WES的研究证明,不同标志位点可能表现为癌种特异性,也可具有跨癌种普遍性2种特征,而其余大量微卫星位点高度稳定,无法为MSI-H提供有效信息,故而针对Panel的不同用途(特异性癌种/泛癌种)应选择不同的位点组合[36]。前期PCR-MSI研究表明,单核苷酸重复序列在PCR-MSI检测中敏感度更高[33]。而多核苷酸重复序列本身的多态性导致检测方法对配对正常样本具有依赖性。基于PCR法中的Pentaplex panel的5~7个标志位点组合BAT25、BAT26、NR21、NR22、NR24、NR27和MONO27被认定为PCR-MSI检测的金标准。由此该位点组合也通常在NGS panel中专门被设计和应用于MSI检测。

NGS panel的MSI算法通常通过刻画选取的标志位点不同重复序列长度对应的reads个数在MSI-H和MSS中的差异来判断位点的不稳定状态,以不稳定位点比例是否超过既定阈值来确定样本的MSI状态。位点在2种状态差异的评估方法包括:基于癌组织样本和配对正常样本不同重复序列长度对应的reads个数进行$\chi^2$检验(MSIsensor)或者距离评估(MANTIS),以及独立的基于癌组织样本评估重复序列长度的类型个数与一组基线样本(非MSI-H样本)的差异(mSINGS),或者MSS状态下主要的重复序列长度类型(peak)对应的覆盖占位点覆盖的比例在癌组织样本与一组基线样本(非MSI-H样本)的差异(ColonCore-MSI),从而评估位点的稳定状态。选取的标志位点限制为1~5 bp重复单元(如MSIsensor和MANTIS)或仅单碱基重复序列(如ColonCore-MSI)的MS位点。判断样本MSI状态的不稳定位点比例的阈值包括3.5%(MSIsensor)、20%(mSINGS)和40%(ColonCore-MSI)不等。

**参考文献:**

[1] Sinicrope FA, Sargent DJ. Molecular pathways: microsatellite instability in colorectal cancer: prognostic, predictive, and therapeutic implications[J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(6): 1506-1512.

[2] Vilar E, Gruber SB. Microsatellite instability in colorectal cancer: the stable evidence[J]. Nat Rev Clin Oncol,

2010, 7(3): 153 – 162.

[3] 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.

[4] Haraldsdottir S. Microsatellite instability testing using next-generation sequencing data and therapy implications [J/OL]. JCO Precision Oncol, (2017-10-03)[2019-05-08]. https://ascopubs. org/doi/pdf/10. 1200/PO. 17. 00189.

[5] National Comprehensive Cancer Network. NCCN clinical practice guidelines in oncology(NCCN Guideline). Colon cancer, version 1. 2019 [EB/OL]. (2019-03-15) [2019-05-08]. https://www. nccn. org.

[6] National Comprehensive Cancer Network. NCCN clinical practice guidelines in oncology(NCCN Guideline). Rectal cancer, version 1. 2019[EB/OL]. (2019-03-15) [2019-05-08]. https://www. nccn. org.

[7] Chinese Society of Clinical Oncology (CSCO) diagnosis and treatment guidelines for colorectal cancer working group. Chinese Society of Clinical Oncology (CSCO) diagnosis and treatment guidelines for colorectal cancer 2018 (English version)[J]. Chin J Cancer Res, 2019, 31(1):117 – 134.

[8] Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer[J]. N Engl J Med, 2003, 348(10): 919 – 932.

[9] Hampel H, Frankel WL, Martin E, et al. Feasibility of screening for lynch syndrome among patients with colorectal cancer[J]. J Clin Oncol, 2008, 26(35): 5783 – 5788.

[10] Pathak SJ, Mueller JL, Okamoto K, et al. EPCAM mutation update: Variants associated with congenital tufting enteropathy and Lynch syndrome [J]. Hum Mutat, 2019,40(2):142 – 161.

[11] 中国抗癌协会妇科肿瘤专业委员会. 子宫内膜癌诊断与治疗指南(第四版)[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2018,34(8):880 – 886.

[12] Moreira L, Balaguer F, Lindor N, et al. Identification of lynch syndrome among patients with colorectal cancer [J]. JAMA, 2012, 308(15): 1555.

[13] Mvundura M, Grosse SD, Hampel H, et al. The cost-effectiveness of genetic testing strategies for Lynch syndrome among newly diagnosed patients with colorectal cancer[J]. Genet Med, 2010, 12(2): 93 – 104.

[14] Ladabaum U, Wang G, Terdiman J, et al. Strategies to identify the lynch syndrome among patients with colorectal cancer[J]. Ann Intern Med, 2011, 155(2): 69.

[15] Watkins JC, Yang EJ, Muto MG, et al. Universal screening for mismatch-repair deficiency in endometrial cancers to identify patients with lynch syndrome and lynch-like syndrome[J]. Int J Gynecol Pathol, 2017,36 (2): 115 – 127.

[16] Dillon JL, Gonzalez JL, DeMars L, et al. Universal screening for Lynch syndrome in endometrial cancers: frequency of germline mutations and identification of patients with Lynch-like syndrome [J]. Hum Pathol, 2017, 70: 121 – 128.

[17] National Comprehensive Cancer Network. NCCN clinical practice guidelines in oncology(NCCN Guideline). Uterine neoplasms, version 3. 2019 [EB/OL]. (2019-02-11)[2019-05-08]. https://www. nccn. org.

[18] 中国抗癌协会大肠癌专业委员会遗传学组. 遗传性结直肠癌临床诊治和家系管理中国专家共识[J]. 实用肿瘤杂志, 2018,33(1):3 – 8.

[19] Palomaki GE, McClain MR, Melillo S, et al. EGAPP supplementary evidence review: DNA testing strategies aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome[J]. Genet Med, 2009,11(1):42 – 65.

[20] Latham A, Srinivasan P, Kemel Y, et al. Microsatellite instability is associated with the presence of Lynch syndrome pan-cancer[J]. J Clin Oncol, 2019, 37(4): 286 – 295.

[21] National Comprehensive Cancer Network. NCCN clinical practice guidelines in oncology(NCCN Guideline). Genetic/familial high-risk assessment: colorectal, version 1. 2018[EB/OL]. (2018-03-05) [2019-05-08]. https://www. nccn. org.

[22] Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis [J]. J Clin Oncol, 2005,23(3):609 – 618.

[23] Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer[J]. N Engl J Med, 2003,349(3):247 – 257.

[24] 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.

[25] Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer[J]. Ann Oncol, 2016,27 (8):1386 – 1422.

[26] Le DT, Durham JN, Smith KN, et al. Mismatch-repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade[J]. Science, 2017,357(6349):409 – 413.

[27] Reis-Filho JS. Detecting MSI and TRK fusion using NGS: ESMO recommendations [C]. Munich: ESMO,

2018.

[28] 《结直肠癌分子生物标志物检测专家共识》编写组. 结直肠癌分子生物标志物检测专家共识[J]. 中华病理学杂志, 2018,47(4):237 - 240.

[29] Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer[J]. Cancer Res, 1998,58(22):5248 - 5257.

[30] Umar A. RESPONSE: Re: revised bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (lynch syndrome) and microsatellite instability[J]. J Natl Cancer Inst, 2005, 97(12): 937 - 938.

[31] Murphy KM, Zhang S, Geiger T, et al. Comparison of the microsatellite instability analysis system and the Bethesda panel for the determination of microsatellite instability in colorectal cancers[J]. J Mol Diagn, 2006,8(3):305 - 311.

[32] Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer[J]. Gastroenterology,2010,138(6):2073 - 2087. e3.

[33] Zhu LZ, Huang YQ, Fang XF, et al. A novel and reliable method to detect microsatellite instability in colorectal cancer by next-generation sequencing[J]. J Mol Diagn, 2018, 20(2): 225 - 231.

[34] Middha S, Zhang LY, Nafa K, et al. Reliable pan-cancer microsatellite instability assessment by using targeted next-generation sequencing data[J]. JCO Precis Oncol, 2017(1): 1 - 17.

[35] Niu BF, Ye K, Zhang QY, et al. MSIsensor: microsatellite instability detection using paired tumor-normal sequence data[J]. Bioinformatics,2014,30(7):1015 - 1016.

[36] Salipante SJ, Scroggins SM, Hampel HL, et al. Microsatellite instability detection by next generation sequencing[J]. Clin Chem, 2014,60(9):1192 - 1199.

[37] Kautto EA, Bonneville R, Miya J, et al. Performance evaluation for rapid detection of pan-cancer microsatellite instability with MANTIS[J]. Oncotarget, 2017,8(5): 7452 - 7463.

[38] Chalmers ZR, Connelly CF, Fabrizio D, et al. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden[J]. Genome Med, 2017,9(1):34.

[39] Artyomenko A, Sikora M, Lefterova M, et al. Microsatellite instability detection by targeted sequencing of cell-free DNA[J]. Ann Oncol,2018,29 (Suppl 8):viii400 - viii441.

[40] Gowen K, Clark TA, Gregg JP, et al. MSI-H testing via hybrid capture based NGS sequencing of liquid biopsy samples[J]. J Clin Oncol, 2019, 37(suppl 4): 504.

[41] Sun J, Cai Z, He SB, et al. Microsatellite instability detection from plasma of colorectal cancer patients[J]. J Clin Oncol, 2019,37 (suppl 4): abstr 515.

[42] Zhang XC, Li J. Era of universal testing of microsatellite instability in colorectal cancer[J]. World J Gastrointest Oncol, 2013, 5(2): 12 - 19.

[43] Lee JH, Cragun D, Thompson Z, et al. Association between IHC and MSI testing to identify mismatch Repair Deficient patients with ovarian cancer[J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2014, 18(4): 229 - 235.

[44] Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part Ⅰ. The utility of immunohistochemistry [J]. J Mol Diagn, 2008,10(4):293 - 300.

[45] Gibson J, Lacy J, Matloff E, et al. Microsatellite instability testing in colorectal carcinoma: A practical guide [J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2014, 12(2): 171 - 176. e1.

[46] Vanderwalde A, Spetzler D, Xiao NQ, et al. Microsatellite instability status determined by next-generation sequencing and compared with PD-L1 and tumor mutational burden in 11, 348 patients[J]. Cancer Med, 2018, 7(3): 746 - 756.

[47] Xicola RM, Llor X, Pons E, et al. Performance of different microsatellite marker panels for detection of mismatch repair-deficient colorectal tumors [J]. J Natl Cancer Inst, 2007,99(3):244 - 252.

[48] Suraweera N, Duval A, Reperant M, et al. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR[J]. Gastroenterology, 2002,123(6):1804 - 1811.

[49] Murphy KM, Zhang SL, Geiger T, et al. Comparison of the microsatellite instability analysis system and the bethesda panel for the determination of microsatellite instability in colorectal cancers[J]. J Mol Diagn, 2006, 8(3): 305 - 311.