

错配修复基因 hMSH2 和 hMLH1 在结直肠癌组织中的表达及意义

张苗尊¹, 章 维²

(1. 宁波大学医学院附属鄞州医院, 浙江 宁波 315040; 2. 宁波市第二医院, 浙江 宁波 315010)

摘要: [目的] 评价错配修复基因 hMLH1 和 hMSH2 在结直肠癌中的表达及意义。 [方法] 经病理学确诊的结直肠癌手术切除标本 85 例, 术前均未接受过放疗或化疗, 免疫组化检测 hMLH1 和 hMSH2 蛋白表达情况。 [结果] 85 例结直肠癌组中, hMSH2 缺失率为 69.4%(59/85), hMLH1 蛋白缺失率为 78.8%(67/85)。 hMSH2 蛋白缺失率在 T₁、T₂、T₃ 和 T₄ 期结直肠肿瘤中的缺失率分别为 50.0%、43.8%、71.1% 和 82.8%, 随 T 分期增加而增加 ($\chi^2=11.037, P=0.012$)。 有淋巴结转移者的 hMSH2 蛋白缺失率达 88.57%(31/35), 而无淋巴结转移患者的 hMSH2 蛋白缺失率为 56.0%(28/50) ($\chi^2=10.287, P=0.001$)。 hMLH1 蛋白缺失率与肿瘤分化程度和 T 分期相关, 但与性别、年龄、肿瘤部位、N 分期和 M 分期均无关。 [结论] 在结直肠癌组织中存在 hMSH2 和 hMLH1 蛋白缺失, 且 hMSH2 和 hMLH1 蛋白缺失与肿瘤 T 分期和分化程度相关。 检测 hMLH1 和 hMSH2 蛋白表达对预后判断有一定的参考价值。

关键词: 肠肿瘤; 错配修复基因; hMLH1; hMSH2; 免疫组化

中图分类号: P753.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2013)04-0308-04

Expression of Mismatch Repair Gene hMLH1 and hMSH2 in Colorectal Carcinoma and Its Significance

ZHANG Miao-Zun¹, ZHANG Wei²

(1. Yinzhou Hospital Affiliated to Medical School of Ningbo University, Ningbo 315040, China;

2. Ningbo No.2 Hospital, Ningbo 315010, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of mismatch repair gene human mutl homolog 1 (hMLH1) and human mutl homolog 2 (hMSH2) in colorectal carcinoma and its significance. [Methods] A total of 85 pathologically proved patients with colorectal carcinoma undergoing surgical resection were included in the study. All the patients did not undergo preoperative chemotherapy or radiotherapy. The expression of hMLH1 and hMSH2 protein was detected by immunohistochemical method. [Results] The loss rate of hMSH2 and hMLH1 expression in cancer tissue was 69.4%(59/85), 78.8%(67/85) respectively. The loss rate of hMSH2 expression in patients with T₁, T₂, T₃, T₄ was 50.0%, 43.8%, 71.1% and 82.8% respectively. The loss rate of hMSH2 expression increased with T stage increasing ($\chi^2=11.037, P=0.012$). The loss rate of hMSH2 expression in patients with lymph node metastases was 88.57%(31/35), but 56.0%(28/50) in patients without lymph node metastases with significant difference ($\chi^2=10.287, P=0.001$). The loss rate of hMLH1 expression was correlated to tumor differentiation and T stage, but not correlated to gender, age, tumor site, N stage and M stage. [Conclusion] Loss expression of hMLH-1 and hMSH-2 protein exists in colorectal carcinoma. Expression loss of hMLH-1 and hMSH-2 protein correlates to tumor differentiation and T stage. Combined detection of hMLH-1 and hMSH-2 expression might be useful for evaluating prognosis of colorectal cancer.

Key words: colorectal carcinoma; mismatch repair genes; hMLH1; hMSH2; immunohistochemical method

肿瘤发生是一个多步骤、多阶段的过程, 涉及多种癌基因和抑癌基因的突变和积累。错配修复(mismatch repair, MMR)基因功能的失活, 导致癌基因激

活和抑癌基因失活, 最终引起细胞恶变和肿瘤形成^[1]。研究显示, MMR 基因中 human mutl homolog 1 (hMLH1) 和 human mutl homolog 2 (hMSH2) 的突变与 90% 遗传性非息肉性结直肠癌 (hereditary non-polyposis colorectal cancer, HNPCC) 的发病密切相关^[2]。

收稿日期: 2012-11-17; 修回日期: 2013-01-30

E-mail: idreamof333@126.com

本研究采用免疫组化方法检测肠癌组织中 hMLH1 和 hMSH2 表达情况,并对其临床病理资料进行回顾性分析,以探讨 hMLH1 和 hMSH2 表达在结直肠癌诊疗中的临床意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2008~2011 年经病理学确诊的的大肠癌手术切除标本 85 例,所有患者在术前均未接受过放疗或化疗。其中男性 49 例,女性 36 例;年龄 38~78 岁,平均年龄 58.72 ± 10.94 岁,中位年龄 59 岁;直肠癌 55 例,结肠癌 30 例;高分化腺癌 13 例,中分化腺癌 49 例,低分化腺癌 23 例。有淋巴结转移 35 例(N_1 19 例, N_2 16 例),有远处转移 6 例。另取肠镜活检取无肿瘤患者肠黏膜上皮 20 例作为对照,其中男性 14 例,女性 6 例;年龄 37~72 岁。

1.2 方法

鼠抗人 hMSH2 和 hMLH1 的单克隆抗体为 Santa Cruz Biotechnology 公司产品。PV-9000 二步法免疫组织化学检测试剂盒、抗原修复液、DAB 显色液、PBS 缓冲液购自福州迈新生物技术有限公司。

所有标本经 10%福尔马林固定,石蜡包埋,5 μ m 连续切片,贴于经 APES 处理的载玻片上,分别进行 HE 染色和免疫组织化学染色。免疫组化染色 SP 法主要步骤如下:石蜡切片脱蜡至水,柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)微波抗原修复,3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶,室温 20 min,血清封闭 30 min,一抗(hMSH2 和 hMLH1) 4 $^{\circ}C$ 过夜,DAB 显色,滴加生物素标记二抗,37 $^{\circ}C$ 孵育 30min,PBS 冲洗 3 次 \times 5min;滴加辣根过氧化物酶标记的链霉素卵白素工作液,37 $^{\circ}C$ 孵育 30min,PBS 冲洗 3 次 \times 5min;苏木素复染。常规脱水、透明、中性树脂封片。用已知阳性标本切片做阳性对照,PBS 代替一抗做阴性对照。

1.3 结果判定

每张切片选择有代表性的区域,并避开切片周边区域,光镜下随机观察 5 个高倍镜视野。参照 Friedrichs 等^[3]免疫组化评判标准,染色深浅需与背景染色相对比,分别对染色强度进行计分。染色强度计分:无色为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。0 分为无表达,1 分为低表达。

hMSH2/hMLH1 蛋白低表达或蛋白表达缺失视为蛋白缺失^[4]。

1.4 统计学处理

数据分析采用 SPSS17.0 软件,hMSH2 和 hMLH1 的缺失率比较采用 χ^2 检验,hMSH2 和 hMLH1 的相关性分析采用 Spearman 相关分析,hMSH2 和 hMLH1 一致性检验采用 Kappa 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hMSH2 和 hMLH1 在肠癌组织中的表达

hMSH2 和 hMLH1 蛋白主要在上皮细胞核及部分胞质中表达,间质细胞偶有表达。正常结直肠组织均有 hMSH2 和 hMLH1 表达,染色深呈棕褐色。

在 85 例肠癌组织中,26 例 hMSH2 正常表达,而 59 例呈不同程度的 hMSH2 表达缺失,hMSH2 缺失率为 69.4%(59/85)。正常肠组织组中 hMSH2 蛋白缺失率为 5.0%(1/20),肠癌组与正常组织组 hMSH2 蛋白缺失率比较差异有统计学意义($\chi^2=23.475, P < 0.001$)。

在 85 例肠癌组织中,hMLH1 蛋白正常表达 18 例,缺失表达 67 例,hMLH1 蛋白缺失率为 78.8%(67/85),而正常肠组织组中 hMLH1 蛋白缺失率为 10.0%(2/20),肠癌组与正常组织组 hMLH1 蛋白缺失率相比差异有统计学意义($\chi^2=29.678, P < 0.001$)。

2.2 hMSH2 和 hMLH1 蛋白缺失率与肠癌临床病理特征间的关系

hMSH2 蛋白缺失率在 T_1 、 T_2 、 T_3 和 T_4 期结直肠肿瘤中的缺失率分别为 50.0%、43.8%、71.1% 和 82.8%,随 T 分期增加而增加($\chi^2=11.037, P=0.012$)。有淋巴结转移者的 hMSH2 蛋白缺失率达 88.57%(31/35),而无淋巴结转移患者的 hMSH2 蛋白缺失率为 56.0%(28/50),两组差异有统计学意义($\chi^2=10.287, P=0.001$)。分析 hMSH2 表达与其他临床病理特征间关系显示:hMSH2 蛋白缺失率与分化程度相关,随着肿瘤分化程度的降低,hMSH2 蛋白表达缺失率也逐渐增多($\chi^2=16.507, P=0.001$)。hMSH2 蛋白缺失率与性别、年龄、肿瘤部位和 M 分期均无关(Table 1)。

hMLH1 蛋白缺失率在 T_1 、 T_2 、 T_3 和 T_4 期肠肿瘤中分别为 50.0%、37.5%、94.7% 和 82.7%,也随 T 分期增加而增加($\chi^2=22.675, P < 0.001$)。hMLH1 蛋白缺

失率与分化程度相关,随着肿瘤分化程度的降低,hMSH2 蛋白表达缺失率也逐渐增多 ($\chi^2=22.675,P=0.001$)。但与性别、年龄、肿瘤部位、N 分期和 M 分期均无关 (Table 1)。

2.3 hMSH2 和 hMLH1 表达相关性

hMSH2 和 hMLH1 蛋白表达呈正相关 ($r=0.718,P<0.001$)。hMSH2 和 hMLH1 蛋白表达经 Kappa 一致性检验, Kappa=0.697($P<0.001$)。

3 讨论

研究发现,DNA 在复制过程中常常出现碱基错配,碱基错配由错配修复基因负责修复,从而使 DNA 复制错误减少。一旦错配修复基因发生缺陷,就会造成碱基错配的积聚,DNA 突变率增加,影响癌基因和抑癌基因、细胞增殖和细胞凋亡,从而引起肿瘤发生。基因不稳定性在结直肠癌发生中起着重要作用^[5]。Fishel 等^[6]研究人类遗传性非息肉结肠癌(hereditary non polyposis colorectal cancer,HNPCC)时,分离克隆到 hMSH2 基因,这是第一个人类 MMR 基因。hMSH2 基因位于人类染色体 2p21~p22,基因组 DNA 全长约 73kb,含 16 个外显子,cDNA 全长 3 111 bp,含 2 727 bp 的开放阅读框架。hMSH2 编码的氨基酸由 930 个腺嘌呤、526 个胞嘧啶、688 个鸟嘌呤、803 个胸腺嘧啶组成。该基因与细菌的 mut S 同源,是高度保守的 DNA MMR 基因。研究证实 hMSH2 在保证 DNA 复制的完整性和稳定性中起着重要作用^[7]。

研究发现,在多种肿瘤中(如肠癌、卵巢癌、子

Table 1 The relationship of hMSH2,hMLH1 expression and clinicopathological features of colorectal cancer

Clinicopathological features	N	hMSH2				hMLH1			
		Loss N	Loss rate (%)	χ^2	P value	Loss N	Loss rate (%)	χ^2	P value
Gender				2.059	0.151			5.664	0.017
Male	49	31	63.3			35	71.4		
Female	36	28	77.8			32	88.9		
Age(year)				0.286	0.593			0.753	0.386
≥ 50	59	42	71.2			45	76.3		
< 50	26	17	65.4			22	84.6		
Tumor location				0.008	0.931			4.105	0.043
Rectum	55	38	69.1			47	85.5		
Colon	30	21	70.0			20	66.7		
Grade				16.507	0.001			18.356	<0.01
High	13	4	30.8			3	23.1		
Middle	49	32	65.3			43	87.8		
Low	23	23	100.0			21	91.3		
T stage				11.037	0.012			22.675	<0.001
1	2	1	50.0			1	50.0		
2	16	7	43.8			6	37.5		
3	38	27	71.1			36	94.7		
4	29	24	82.8			24	82.7		
N stage				13.518	0.001			4.103	0.129
0	50	28	56.0			37	74.0		
1	19	16	84.2			17	89.5		
2	16	15	93.7			13	81.2		
M stage				2.845	0.092			0.079	0.779
0	79	53	67.1			62	78.5		
1	6	6	100.0			5	83.3		

Table 2 The relationship of hMSH2 and hMLH1 expression

Index	hMLH1			
	Expression(%)	Loss(%)	χ^2	P value
hMSH2 Expression(26)	17(65.4)	9(34.6)		
Loss(59)	1(1.7)	58(98.3)	43.857	<0.001
Total(85)	18(21.2)	67(78.8)		

宫内膜癌和胆管癌等) 均可检测到 hMLH1 和 hMSH2 基因的突变^[8-11]。hMLH1 和 hMSH2 基因是错配修复家族中与肿瘤关系密切的两个基因。错本修复途径是肠癌发生的两条经典途径之一。Gu 等^[12]研究 195 例肠癌组织中的 hMLH1 和 hMSH2 的缺失率,结果显示 hMLH1 和 hMSH2 缺失率均与浸润深度有关。卢晓晔等^[4]分析发现 hMSH2 和 hMLH1 蛋白缺失与肿瘤分化程度相关,随着肿瘤分化程度的降低,hMLH1 和 hMSH2 表达缺失也逐渐增多,错配修复功能的缺陷可能导致肿瘤恶性程度加重。本文结果显示,在 85 例肠癌组织中 hMSH2 缺失率为

69.4%(59/85),hMLH1 缺失率为 78.8%(67/85)。hMSH2 和 hMLH1 蛋白缺失率均随 T 分期增加而增加($\chi^2=11.037$, $P=0.012$)。有淋巴结转移者的 hMSH2 蛋白缺失率为 88.57%(31/35), 而无淋巴结转移患者的 hMSH2 蛋白缺失率为 56.0%(28/50)($\chi^2=10.287$, $P=0.001$)。hMSH2 和 hMLH1 蛋白缺失率也随肿瘤分化程度而降低, hMSH2 和 hMLH1 蛋白表达缺失率也逐渐增多。此结果与其他学者的报道基本一致。

Koessler 等^[13]在 2 060 例大肠癌患者中发现, hMSH2 多态性与患者生存率有关。MSH2rs4638843 与大肠癌患者 5 年总生存率、疾病相关生存率均有关。邹劲林^[14]用免疫组化 SP 法检测 50 例结直肠癌组织中 Cyclin D1 和 hMSH2 蛋白表达, 多因素分析显示 Cyclin D1 ($RR=2.405$, $P<0.05$) 和 hMSH2 ($RR=2.312$, $P<0.05$) 的表达是结直肠癌的重要预后因素。

综上所述, 在结直肠癌组织中存在错配修复基因 hMSH2 和 hMLH1 蛋白缺失, 且表达缺失与肿瘤分期有关。通过免疫组化方法检测 hMLH1 和 hMSH2 蛋白表达对其后期的治疗和预后判断有参考价值。

参考文献:

- [1] Xuan ZX, Lin GL, Yu X, et al. Expression of hMLH1 in rectal intraepithelial and early rectal carcinoma[J]. Chin J Gastrointest Surg, 2012, 15(11): 1162-1165. [玄之玄, 林国乐, 于新明, 等. hMLH1 在直肠上皮内瘤变和早期直肠癌组织中表达[J]. 中会胃肠外科杂志, 2012, 15(11): 1162-1165.]
- [2] Zhang R, Qin W, Xu GL, et al. A meta-analysis of the prevalence of somatic mutations in the hMLH1 and hMSH2 genes in colorectal cancer[J]. Colorectal Dis, 2012, 14(3): e80-89.
- [3] Friedrichs K, Gluba S, Eidtmann H, et al. Over expression of p53 and prognosis in breast cancer[J]. Cancer, 1993, 72(12): 3641-3647.
- [4] Lu XY, Luo HL, Qin L. Expression of hMSH2 and hMLH1 in sporadic rectal carcinoma[J]. Guangdong Medical Journal, 2011, 32(8): 1018-1020. [卢晓晔, 罗惠莉, 覃莉. 散发性结直肠癌组织中 hMSH2 和 hMLH1 的表达及其意义[J]. 广东医学, 2011, 32(8): 1018-1020.]
- [5] Zhang J, Wei J, Wang SJ, et al. Expression of Twist, ARF and E-cadherin and its clinical significance in colorectal cancer[J]. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2011, 38(3): 143-147. [张娟, 魏君, 王士杰, 等. Twist, ARF 和 E-cadherin 在大肠癌组织中的表达及临床意义[J]. 中国肿瘤临床, 2011, 38(3): 143-147.]
- [6] Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary non polyposis colon cancer[J]. Cell, 1993, 75(5): 1027-1038.
- [7] Sidelnikov E, Bostick RM, Flanders WD, et al. Colorectal mucosal expression of MSH2 as a potential biomarker of risk for colorectal neoplasms[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009, 18(11): 2965-2973.
- [8] Gammie AE, Erdeniz N, Beaver J, et al. Functional characterization of pathogenic human MSH2 missense mutations in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Genetics, 2007, 177(2): 707-721.
- [9] Yu J, Zhao F, Liang LP, et al. Clinical significance of expression of hMLH-1 and hMSH-2 in sporadic colorectal carcinoma in Chinese Han patients in Xinjiang[J]. World Chinese Journal of Digestology, 2012, 20(33): 3218-3224. [于静, 赵峰, 梁丽萍, 等. hMLH-1 和 hMSH-2 蛋白在新疆汉族散发性大肠癌中的表达及意义[J]. 世界华人消化杂志, 2012, 20(33): 3218-3224.]
- [10] Li YY, He H, Zeng B. Relationship of DNA mismatch repair gene hMLH1 and hMSH2 expression with chemoresistance of the cisplatin-resistant human ovarian cancer SKOV3/DDP cell line[J]. Chinese Journal of clinical oncology, 2011, 38(15): 875-877. [李渊渊, 何华, 曾飏. 错配修复基因 hMLH1 和 hMSH2 的表达与人卵巢癌顺铂耐药的关系[J]. 中国肿瘤临床, 2011, 38(15): 875-877.]
- [11] Liu H, Dou ZL, Jia ZH, et al. hMLH1 expression in transitional cell carcinoma of bladder[J]. Chin J Exp Surg, 2010, 27(3): 295-296. [刘辉, 窦中岭, 贾招辉, 等. 错配修复基因 hMLH1 在膀胱移行细胞癌中的表达及其意义[J]. 中华实验外科杂志, 2010, 27(3): 295-296.]
- [12] Gu M, Bae YK, Kim AR, et al. Expression of hMLH1, hMSH2 and hMSH6 in small intestinal carcinomas [J]. Hepatogastroenterology, 2012, 59(119). [Epub ahead of print].
- [13] Koessler T, Azzato EM, Perkins B, et al. Common germ line variation in mismatch repair genes and survival after a diagnosis of colorectal cancer[J]. Int J Cancer, 2009, 124(8): 1887-1891.
- [14] Zou JL, Lin ZD, Tang C. Expressions of Cyclin D1 and hMSH2 in colorectal cancer and its pathological characteristics[J]. Chin J Prev Contr Chron Dis, 2012, 20(6): 675-677. [邹劲林, 林志东, 汤聪. Cyclin D1 和 hMSH2 在结直肠癌组织中的表达及其意义[J]. 中国慢性病预防与控制, 2012, 20(6): 675-677.]