

散发性结直肠癌组织中 hMSH2 和 hMLH1 的表达研究

余国庆¹, 赫永金¹, 许迪锋¹, 朱玲华²

(1. 杭州市萧山区第四人民医院, 浙江 杭州 311225;

2. 浙江大学附属邵逸夫医院, 浙江 杭州 310016)

摘要: [目的] 分析散发性结直肠癌中的 hMLH1 和 hMSH2 蛋白表达情况。[方法] 选取经病理学确诊并在术前未接受过放疗或化疗的结直肠癌手术切除标本 127 例, 以及内镜活检无肿瘤患者肠黏膜上皮 20 例。用免疫组化方法检测 hMLH1 和 hMSH2 蛋白表达情况。[结果] 结直肠癌组织中 hMSH2 蛋白表达缺失率为 65.4%(83/127), 高于对照肠组织 (20.0%, $\chi^2=14.714, P<0.001$)。结直肠癌组织中 hMSH2 蛋白缺失率随 T 分期增加而增加 ($\chi^2=8.233, P=0.041$); 与 N 分期有关 ($\chi^2=20.235, P<0.001$), 有淋巴结转移者患者中 hMSH2 蛋白表达缺失率达 87.1%(27/31), 高于无淋巴结转移患者 (54.2%) ($\chi^2=9.250, P=0.002$)。hMLH1 蛋白表达缺失率为 74.0%, 与 T 分期 ($\chi^2=29.115, P<0.001$)、N 分期 ($\chi^2=9.807, P=0.006$)、M 分期 ($\chi^2=7.363, P=0.007$) 有关。[结论] 结直肠癌组织中存在 hMLH1 和 hMSH2 蛋白表达缺失, 通过免疫组化方法检测, 可以简便、准确地发现错配修复基因的突变, 可为后期的治疗和预后判断提供参考。

主题词: 结直肠肿瘤; 错配修复基因; hMLH1; hMSH2; 免疫组织化学

中图分类号: R735.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2014)07-0564-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2014.07.B008

Expression of hMLH1 and hMSH2 in Patients with Sporadic Colorectal Cancer

YU Guo-qing, HE Yong-jin, XU Di-feng, et al.

(The People's No. 4 Hospital of Xiaoshan, Hangzhou 311225, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the expression of human mutL homolog 1(hMLH1) and human mutS homolog 2 (hMSH2) in sporadic colorectal cancer. [Methods] Expression of hMLH1 and hMSH2 in 127 cases with colorectal cancer without radiotherapy or chemotherapy before operation and 20 cases of non-cancer patients endoscopically proved was detected immunohistochemically. [Results] The loss rate of hMSH2 expression in colorectal cancer tissue was higher than that in control tissue (65.4% vs 20.0%, $\chi^2=14.714, P<0.001$). The loss rate of hMSH2 expression increased with T staging ($\chi^2=8.233, P=0.041$), and was correlated with N stage ($\chi^2=20.235, P<0.001$). The loss rate of hMSH2 expression in patients with lymph node metastases was 87.1% (27/31), higher than that in patients without lymph node metastases (54.2%) ($\chi^2=9.250, P=0.002$). The loss rate of hMLH1 expression in colorectal cancer tissue was 74.0%, and was correlated with T stage ($\chi^2=29.115, P<0.001$), N stage ($\chi^2=9.807, P=0.006$), M stage ($\chi^2=7.363, P=0.007$). [Conclusion] There is loss expression of hMLH1 and hMSH2 in colorectal cancer, and immunohistochemistry can find mutation of mismatch repair genes easily and accurately, which can provide a reference for late treatment and prognostic evaluation.

Subject words: colorectal neoplasms; mismatch repair gene; hMLH1; hMSH2; immunohistochemistry

结直肠癌发生是一个涉及多基因改变和多步骤的累积过程, 基因不稳定性在结直肠癌发生中起重要作用。错配修复 (mismatch repair, MMR) 作为一种重要的

复制后修复系统, 起着维持 DNA 复制保真性、控制基因突变的作用^[1]。但 hMLH1 和 hMSH2 蛋白在结直肠癌中的表达及意义仍存在争议。本研究采用免疫组化方法检测结直肠癌组织中 hMLH1 和 hMSH2 蛋白表达情况, 并对其临床病理资料进行分析, 以探讨 hMLH1 和 hMSH2 表达在结直肠癌中的意义。

通讯作者: 余国庆, 副主任, 副主任医师, 学士; 浙江省杭州市萧山区第四人民医院外二科, 浙江省杭州市萧山区义蓬镇义盛路 284 号 (311225); E-mail: hehebianyu@sina.com

收稿日期: 2014-05-09

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2010~2013 年经病理学确诊的结直肠癌手术切除标本 127 例,所有患者在术前均未接受过放疗或化疗。其中男性 76 例,女性 51 例;年龄 36~82 岁,平均年龄(59.15 ± 10.28)岁,中位年龄 58 岁;直肠癌 83 例,结肠癌 44 例。肿瘤最大径 1.7~10.8cm,肿瘤大小中位值为 4.2cm;高分化腺癌 9 例,中分化腺癌 87 例,低分化腺癌 31 例。有淋巴结转移 99 例。另取肠镜活检无肿瘤患者肠黏膜上皮 20 例作对照,其中男性 12 例,女性 8 例;年龄 38~72 岁。

1.2 试剂

免疫组化染色 SP 试剂盒购自福州迈新生物技术有限公司。鼠抗人 hMSH2 和 hMLH1 单克隆抗体为 Santa Cruz Biotechnology 公司产品。

1.3 方法

所有标本经 10% 福尔马林溶液固定,石蜡包埋,5 μ m 连续切片。

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 20min,血清封闭 30min,一抗(hMSH2/hMLH1)4 $^{\circ}C$ 过夜,滴加生物素标记二抗,37 $^{\circ}C$ 孵育 30min,PBS 冲洗 3 $\times$ 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 $\times$ 5min;DAB 显色,苏木素复染。常规脱水、透明、中性树胶封片。用已知阳性标本切片作阳性对照,PBS 代替一抗作阴性对照。

1.4 结果判定

以细胞核出现黄褐色或棕黄色颗粒为 hMSH2/hMLH1 阳性细胞。参照 Friedrichs 等^[2]的免疫组化评判标准,分别对染色强度进行计分:染色深浅需与背景染色相对比,无色为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。hMSH2/hMLH1 染色强度 0~1 分视为其不同程度的表达缺失^[3]。

1.5 统计学处理

数据分析采用 SPSS16.0 软件,不同临床病理特征间的 hMSH2 和 hMLH1 的表达缺失率比较采用 χ^2 检验,hMSH2 和 hMLH1 两者相关性分析采用 Spearman 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 hMSH2 和 hMLH1 在结直肠癌组织中的表达

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。染色深呈棕褐色(Figure 1,2)。在 127 例结直肠癌组中,44 例 hMSH2 正常表达,而 83 例呈不同程度 hMSH2 表达缺失,hMSH2 表达缺失率为 65.4%(83/127)。而对照组肠组织中 hMSH2 蛋白表达缺失率为 20.0%(4/20),两组

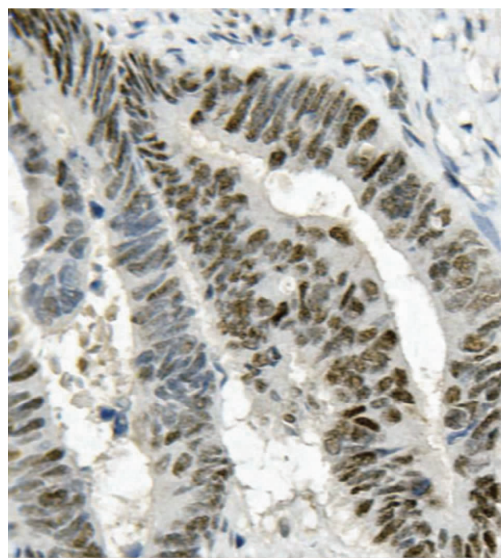


Figure 1 hMLH1 expression(+) in moderate differentiated adenocarcinoma (SP $\times$ 400)

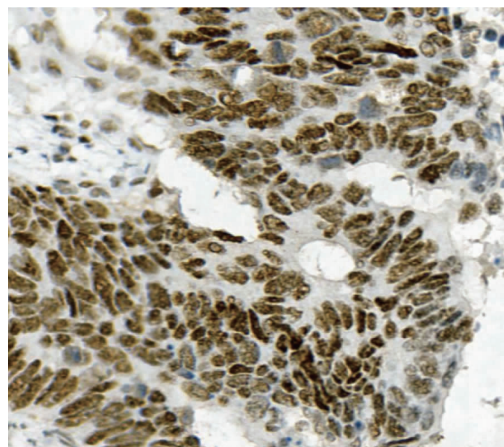


Figure 2 hMSH2 expression(++) in moderate differentiated adenocarcinoma (SP $\times$ 400)

hMSH2 蛋白表达缺失率相比差异有统计学意义($\chi^2=14.714, P<0.001$)。在 127 例结直肠癌组中,33 例 hMLH1 蛋白正常表达,94 例 hMLH1 表达缺失, hMLH1 蛋白表达缺失率为 74.0%(94/127),明显高于对照组肠组织的 30.0%(6/20)($\chi^2=15.391, P<0.001$)。

2.2 hMSH2 和 hMLH1 蛋白表达缺失率与结直肠癌临床病理特征间的关系

hMSH2 蛋白表达缺失率随 T 分期增加而增加,差异有统计学意义($\chi^2=8.233, P=0.041$);与 N 分期有关($\chi^2=20.235, P<0.001$),有淋巴结转移者 31 例患者中 hMSH2 蛋白表达缺失 27 例,表达缺失率达 87.1%(27/31),无淋巴结转移患者 48 例患者 hMSH2 蛋白表达缺失率为 54.2%(26/48),差异有统计学意义($\chi^2=9.250, P=0.002$)。有远处转移的 18 例患者中 hMSH2 蛋白表达缺失率达 100.0%,无远处转移的 109 例患者 hMSH2 蛋白表达缺失率为 59.6%(65/109),差异有统计学意义 ($\chi^2=11.118, P=0.001$)。hMSH2 蛋白表达缺失率与性别、年龄、肿瘤

大小均无关(Table 1)。

同样,hMSH1 蛋白表达缺失率随 T 分期增加而增加,差异有统计学意义 ($\chi^2=29.115, P=0.000$); hMSH2 蛋白表达缺失率与 N 分期 ($\chi^2=9.807, P=0.006$)、M 分期($\chi^2=7.363, P=0.007$)有关,而与性别、年龄、肿瘤大小均无关(Table 1)。

2.3 hMSH2 和 hMLH1 表达的相关性

hMSH2 正常表达的 44 例患者中,hMLH1 蛋白正常表达 26 例(59.1%);在 hMSH2 蛋白表达缺失的 83 例患者中,hMLH1 蛋白表达缺失 76 例,达 91.6%,hMSH2 和 hMLH1 蛋白表达的 Spearman 相关系数为 0.550, $P<0.001$ 。

Table 2 Relationship of hMSH2 and hMLH1 expressions

hMSH2	N	hMLH1(%)	
		Normal	Loss
Normal	44	26(59.1)	18(40.9)
Loss	83	7(8.4)	76(91.6)
Total	127	33(26.0)	94(74.0)

Table 1 Relationship of hMSH2 and hMLH1 expressions and the clinicalpathological features in colorectal cancer

Features	N	hMSH2				HMLH1			
		Loss number	Loss rate(%)	χ^2	P	Loss number	Loss rate(%)	χ^2	P
Gender									
Male	76	49	64.5	0.065	0.799	5	69.7	1.802	0.180
Female	51	34	66.7			41	80.4		
Age(years old)									
≥50	79	54	68.4	0.831	0.362	58	73.4	0.039	0.844
<50	48	29	60.4			36	75.0		
Tumor size(cm)									
>4	78	53	67.9	0.601	0.438	56	71.8	1.929	0.165
≤4	49	30	61.2			38	77.6		
T stage									
T ₁	9	4	44.4	8.233	0.041	5	55.6	29.115	0.000
T ₂	28	14	50.0			11	39.3		
T ₃	47	31	66.0			44	93.6		
T ₄	43	34	79.1			34	79.1		
N stage									
N ₀	74	37	50.0	20.235	0.000	48	64.9	9.807	0.007
N ₁	25	24	96.0			24	96.0		
N ₂	28	22	78.6			22	78.6		
M stage									
M ₀	109	65	59.6	11.118	0.001	76	69.7	7.363	0.007
M ₁	18	18	100.0			18	100.0		
Defferetiation									
Well	9	6	66.7	14.873	0.001	5	55.6	14.921	0.001
Moderate	87	48	55.2			58	66.7		
Poorly	31	28	93.5			31	1000		

3 讨论

肿瘤的发生与发展涉及很多体内外因素,现已知正常体细胞突变是肿瘤发生的重要环节,但机体细胞同时也存在一种可修复突变基因的系统,即MMR系统。细胞MMR系统功能丧失,使复制时发生的碱基错配得不到纠正,从而使基因突变累积,导致肿瘤发生。约85%结直肠癌表现为染色体不稳定,仅有约15%表现为微卫星不稳定(MSI)。MSI是由MMR系统功能异常所引起的。Fishel等^[4]研究人类遗传性非息肉性结肠癌(hereditary non polyposis colorectal cancer, HNPCC)时,分离克隆到*hMSH2*基因,属mutS家族,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3111bp,含2727bp的开放阅读框架。现已证实,*hMSH2*能够移动初级模板在DNA重复序列滑动时产生的插入/缺失环,纠正逃脱校正读码的单碱基错配,以预防自发突变的堆积,并保证DNA复制的完整性和稳定性^[5]。

*hMLH1*基因编码产生hMLH1蛋白,在多种组织中均有表达,包括结肠、淋巴、细胞、乳腺、肺、睾丸、前列腺、胆囊和心脏等。hMLH1蛋白参与激活核酸内切酶,从而启动MMR^[6]。*hMSH2*基因编码产生hMSH2蛋白,hMSH2蛋白通过与hMSH6或hMSH3蛋白结合成异源二聚体,这种复合蛋白可以识别并结合到错配的DNA序列,从而在错配修复中发生作用^[7]。当*hMLH1*、*hMSH2*基因发生突变时,则不能编码产生正常的hMLH1、hMSH2蛋白,即hMLH1、hMSH2蛋白表达缺失,其所参与的错配修复机制亦不能正常进行。

研究指出,MMR蛋白表达缺失与结直肠癌患者某些临床病理特征有一定相关性,在结直肠癌的临床诊治中具有重要的指导意义。Sidelnikov等^[8]用免疫组织化学法标记hMSH2蛋白,最后用定量图像分析法进行分析,结果显示在升结肠和直肠组织中,hMSH2的表达阳性率在病例组中为23%,而在对照组为49%($P=0.06$)。hMSH2低表达可能与患结直肠癌的风险增高有关,hMSH2可能可以作为结直肠癌的潜在生物标志物。

研究发现,在多种肿瘤中(如肠癌、卵巢癌、子宫

内膜癌和胆管癌等)均可检测到*hMSH2*基因的突变^[9]。于显博等^[10]检测新疆地区散发性结直肠癌患者肿瘤切除标本hMLH1、hMSH2蛋白表达水平,显示新疆地区散发性结直肠癌患者存在MMR蛋白表达缺失,且其表达缺失与患者体质指数、肿瘤位置、肿瘤分化程度、肿瘤家族史有关。卢晓晔等^[11]研究中hMLH1、hMSH2蛋白表达与结直肠癌患者临床病理特征之间的关系显示,hMSH2和hMLH1蛋白的缺失与肿瘤的分化程度相关,随着肿瘤分化程度的降低,hMLH1和hMSH2的表达缺失也逐渐增多,提示MMR的hMLH1和hMSH2蛋白的缺失在低分化的结直肠癌中常见,MMR功能的缺陷可能导致肿瘤恶性程度加重。

本文结果显示结直肠癌组织中hMSH2表达缺失率为65.4%(83/127),hMLH1蛋白表达缺失率为74.0%(94/127),均高于对照肠组织中hMSH2和hMLH1蛋白表达缺失率,且均与肿瘤TNM分期有关。

Koessler等^[12]在2060例大肠癌患者中发现,*hMSH2*多态性与患者生存率有关。*MSH2*rs4638843与患者5年总生存率、疾病相关生存率均有关。Samowitz等^[13]的研究提示有与MMR有关的基因缺陷的直肠癌患者死亡危险度较高(RR=2.47,95%CI:1.13~5.40),预后差。冯莉等^[14]选取91例经病理确诊的行直肠癌根治术患者,采用免疫组织化学法检测患者hMLH1、hMSH2蛋白表达情况,单因素及多因素分析显示hMLH1和(或)hMSH2蛋白情况及淋巴结转移数目为直肠癌患者预后的影响因素($P=0.010$, $P=0.032$),且为独立影响因素;hMLH1和(或)hMSH2蛋白表达缺失的患者的2年无病生存率较hMLH1和hMSH2蛋白表达无缺失的患者明显提高($P=0.036$),hMLH1、hMSH2蛋白表达缺失的患者预后较好。Gu等^[15]认为肠癌组织中hMLH1、hMSH2表达缺失率与浸润深度相关,但与生存期无关。可见,hMLH1和hMSH2蛋白表达缺失与患者的预后关系还不十分确定,还有待于进一步的研究。

综上,在结直肠癌组织中存在hMSH2和hMLH1蛋白表达缺失,且表达缺失与肿瘤组织分期有关。通过免疫组化方法检测hMLH1和hMSH2蛋白表达可以方便、准确地发现MMR有关的基因的突变,从而可对其后期的治疗和预后判断提供参考。

参考文献:

- [1] Khoo JJ, Gunn A, Peh SC. Pattern of hMLH1, hMSH2 and hMSH6 expression and clinical characteristics in a sample of Malaysian colorectal carcinoma cases [J]. Malays J Pathol, 2013, 35(1):45-57.
- [2] Friedrichs K, Gluba S, Eidtmann H, et al. Over expression of p53 and prognosis in breast cancer [J]. Cancer, 1993, 72(12):3641-3647.
- [3] Hu F, Li D, Wang Y, et al. Novel DNA variants and mutation frequencies of hMLH1 and hMSH2 genes in colorectal cancer in the Northeast China population [J]. PLoS One, 2013, 8(4):e60233.
- [4] 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.
- [5] Słomka M, Stasikowska O, Wagrowska-Danilewicz M, et al. Diagnostic and prognostic values of repair protein hMLH1, hMSH2 and protein CD34 immunorexpression in sporadic colorectal cancer [J]. Pol Merkuriusz Lekarski, 2010, 29(174):351-356.
- [6] Mureșan F, Simescu R, Domșa I, et al. Immunohistochemical screening of hMLH1 and hMSH2 gene mutations in patients diagnosed with colorectal cancer and microsatellite instability suspicion [J]. Chirurgia, 2011, 106(6):775-780.
- [7] Alkhalidi H, Kfoury H. Status of mismatch repair genes hMSH2 and hMSH6 in colorectal cancer in Saudi patients; an immunohistochemical analysis [J]. East Mediterr Health J, 2012, 18(11):1114-1117.
- [8] 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.
- [9] Liu H, Dou ZL, Jia ZH, et al. hMLH1 expression in transitional cell carcinoma of bladder [J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 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.]
- [10] Yu XB, Wang HJ, Sun ZQ, et al. Mismatch repair gene protein expression and clinical significance in patients with sporadic colorectal carcinoma [J]. Chinese General Practice, 2014, 17(8):883-887. [于显博, 王海江, 孙振强, 等. 散发性结直肠癌患者错配修复基因蛋白表达水平及其临床意义 [J]. 中国全科医学, 2014, 17(8):883-887.]
- [11] Lu XX, Luo HL, Qin L. Expression of hMLH1 and hMSH2 in patients with sporadic colorectal carcinoma and its significance [J]. Guangdong Medicine, 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.]
- [12] 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.
- [13] Samowitz WS, Curtin K, Wolff RK, et al. Microsatellite instability and survival in rectal cancer [J]. Cancer Causes Control, 2009, 20(9):1763-1768.
- [14] Fen L, Han J, Lv YL, et al. Analysis of the relationship of the expression deletion of hmlh1 and hmsh2 proteins with the clinico-pathologic features and prognosis of rectal cancer [J]. Chinese Journal of Clinical Oncology, 2012, 39(22):1800-1804. [冯莉, 韩晶, 吕雅蕾, 等. hMLH1 hMSH2 蛋白缺失与直肠癌临床病理特征预后的相关性研究 [J]. 中国肿瘤临床, 2012, 39(22):1800-1804.]
- [15] Gu M, Bae YK, Kim AR, et al. Expression of hMLH1, hMSH2 and hMSH6 in small intestinal carcinomas [J]. Hepatogastroenterology, 2012, 59(119):2228-2232.