

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.23.026

四种错配修复基因蛋白在结直肠癌中的表达及临床意义

谭学贤 杨嶽鑫 罗秋萍 杨 雯 江庆萍[△]

(广州医科大学附属第三医院病理科 广东 广州 510150)

摘要 目的:分析 hMLH1、hMSH2、hMSH6 和 hPMS2 四种错配修复基因蛋白在结直肠癌中的表达及其临床意义。**方法:**随机选取 2013 年 1 月至 2015 年 12 月广州医科大学附属第三医院结直肠癌患者标本 177 例,采用免疫组织化学法检测 hMLH1、hMSH2、hMSH6 和 hPMS2 蛋白的表达情况,并分析蛋白表达与临床参数间关系。**结果:**177 例结直肠癌组织中,hMLH1 蛋白的缺失率为 6.2%(11/177),hMSH2 蛋白的缺失率为 4.0%(7/177),hMSH6 蛋白的缺失率为 1.7%(3/177),hPMS2 蛋白的缺失率为 8.0%(14/177),四者之和占所有结直肠癌病例的 19.8%(35/177)。四种错配修复基因蛋白表达缺失均与肿瘤发生部位有关($P<0.05$),另外,hMLH1 及 hPMS2 蛋白的表达缺失还与肿瘤分化程度相关 ($P<0.05$),hMSH6 蛋白的表达缺失还与肿瘤浸润深度相关($P<0.05$);而缺失均与年龄、性别、淋巴结转移和远处转移无关($P>0.05$)。**结论:**错配修复蛋白的表达在部分结直肠癌组织中出现缺失现象,且与肿瘤部位及分化程度密切相关。hMLH1、hMSH2、hMSH6 和 hPMS2 四种基因的突变,为临床判断预后及拟定治疗方案提供一个有参考价值的依据。

关键词:结直肠癌;错配修复基因;免疫组织化学

中图分类号:R735.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2017)23-4514-04

Expression of the Four Mismatch Repair Genes Protein of Patients with Colorectal Cancer and Its Clinical Significance

TAN Xue-xian, YANG Yue-xin, LUO Qiu-ping, YANG Wen, JIANG Qing-ping[△]

(Department of Pathology, The Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong, 510150, China)

ABSTRACT Objective: To analyze the expression of the four mismatch repair genes protein (hMLH1, hMSH2, hMSH6 and hPMS2) of patients with colorectal cancer and its clinical significance. **Methods:** 177 cases of patients with colorectal cancer in the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University from January 2013 to December 2015 were randomly selected. Tested the expression of the hMLH1, hMSH2, hMSH6 and hPMS2 by immunohistochemistry, the relationship between protein expression and clinical parameters was analyzed. **Results:** Among 177 cases of colorectal cancer tissue, the deletion rate of hMLH1 protein was 6.2% (11/177), the deletion rate of hMLH2 protein was 4.0%(7/177), the deletion rate of hMSH6 protein was 1.7%(3/177), the deletion rate of hPMS2 protein was 8.0%(14/177), the sum of the four values accounted for 19.8%(35/177) of all cases of colorectal cancer. The loss of expression of the four mismatch repair genes protein were correlated to tumor location ($P<0.05$), besides, the loss of expression of the hMLH1 and hPMS2 protein were correlated to degree of tumor differentiation ($P<0.05$), the loss of expression of the hMSH6 protein were correlated to depth of tumor invasion($P<0.05$); But the loss was not correlated to age, sexes, lymph node metastasis and distant metastasis($P>0.05$). **Conclusion:** The expression of loss phenomenon with mismatch repair protein appears in part of colorectal cancer, the loss phenomenon with mismatch repair protein were correlated to tumor location and degree of tumor differentiation. Mutations of four genes in hMLH1, hPMS2, hMSH6 and hMSH2, to provide a reference value for the clinical judgment of prognosis and to develop a treatment plan.

Key words: Colorectal cancer; Mismatch repair genes; Immunohistochemistry

Chinese Library Classification(CLC): R735.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2017)23-4514-04

前言

结直肠癌属于一种恶性肿瘤,在我国结直肠癌发病率较高,并且每年发病人数的增长速度高于世界平均水平^[1]。有研究发现,错配修复基因(mismatch repair, MMR)在结直肠癌的发生

和发展过程中发挥着重要作用。具有缺陷的 MMR 基因诱使正常细胞的 DNA 丧失错配修复功能,加速细胞自身突变的进程,使得细胞内的异常基因不断积累,最终致使发生肿瘤。为此,本研究通过免疫组织化学染色法检测结直肠癌组织中错配修复基因 hMLH1、hMSH2、hMSH6 和 hPMS2 蛋白的表达情况,探索这四种蛋白对结直肠癌的影响及意义。

1 资料与方法

1.1 资料与试剂

选取广州医科大学附属第三医院 2013 年 1 月至 2015 年

作者简介:谭学贤(1985-),女,本科,初级技师,从事肿瘤发病机制方面的研究,E-mail:xiexuexian1985@sina.com

[△] 通讯作者:江庆萍(1972-),女,博士,主任医师,从事肿瘤发病机制方面的研究

(收稿日期:2016-12-03 接受日期:2016-12-30)

12月收治结177例直肠癌患者的临床病例资料,患者均经病理学确诊。其中男103例,女74例;年龄16-92岁,平均年龄(54.27±10.25)岁。试剂:hMLH1单克隆鼠抗人抗体工作液(DAKO)克隆号ES05、hMSH2单克隆鼠抗人抗体工作液(DAKO)克隆号FE11、hMSH6单克隆鼠抗人抗体工作液(北京中杉金桥)克隆号G219-1129和hPMS2单克隆兔抗人抗体工作液(北京中杉金桥)克隆号EP51。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学 取样本置于10%福尔马林溶液中进行固定,采用常规方法连续切片,切片厚度为4 μm,按正常操作对切片进行脱蜡至水。PBS冲洗,均用EDTA(pH=9.0)高压热修复2 min至室温自然冷却20 min,流水冲洗干净,PBS冲洗5 min×3次,3%的H₂O₂浸泡10 min,蒸馏水冲洗干净,PBS冲洗5 min×3次,滴加一抗,连孵育盒放入26℃水浴孵育1小时,PBS冲洗5 min×3次,滴加二抗,连孵育盒放入26℃水浴孵育30 min,PBS冲洗5 min×3次,DAB显色,PBS终止显色,流水冲洗5-10 min,应用苏木素进行复染,依次使用盐酸酒精、乙醇及二甲苯分别用于分化、脱水和透明,最终封片材料使用中性树脂,镜检。

1.2.2 结果判定 hMLH1、hMSH2、hMSH6和hPMS2阳性判断标准参考许良中等^[2]的判定标准,从染色强度和阳性细胞占的比例进行评价。研究中选用的四种MMR均可以在细胞核中进行表达,阳性对照选取正常的结肠粘膜上皮,其染色阳性作为阳性判断标准,而阴性判断标准为细胞核不染色或染色缺失。所有研究结果均通过两名相关专业医生进行双盲检验。

1.3 统计学处理

MMR表达的数据使用SPSS21.0软件进行分析。研究中的

数据用百分率表示,不同组间比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肿瘤组织中四种MMR蛋白的表达情况

四种错配修复蛋白hMLH1、hMSH2、hMSH6和hPMS2阳性染色均在肿瘤细胞的细胞核内表达,呈现为棕黄色颗粒,胞质轻度着色,胞膜和间质不着色。177例结直肠癌组织中,四种MMR蛋白的独自缺失率分别为:hMLH1蛋白的缺失率为6.2%(11/177),hMSH2蛋白的缺失率为4.0%(7/177),hMSH6蛋白的缺失率为1.7%(3/177),hPMS2蛋白的缺失率为8.0%(14/177)。四种MMR蛋白同时存在两者或两者以上缺失分别为:hMLH1/hMSH2共同缺失率为1.1%(2/177),hMLH1/hPMS2共同缺失率为5.6%(10/177),hMSH2/hMSH6共同缺失率为1.1%(2/177),hMSH2/hPMS2共同缺失率为1.7%(3/177),hMLH1/hMSH2/hPMS2共同缺失率为1.1%(2/177)。四种MMR蛋白缺失之和占有结直肠癌病例的19.8%(35/177)。

2.2 四种MMR蛋白表达与临床病理参数的关系

四种MMR蛋白表达缺失整体分析发现,四种MMR蛋白表达缺失与肿瘤发生部位、肿瘤形态、肿瘤浸润深度及肿瘤分化程度有关,差异有统计学意义($P<0.05$);而与年龄、性别、淋巴结转移和远处转移无关($P>0.05$)(表1)。对四种MMR蛋白单独而言,hMLH1蛋白的表达缺失与肿瘤发生部位及肿瘤分化程度有关($P<0.05$);hMSH2蛋白的表达缺失仅与肿瘤发生部位相关($P<0.05$);hMSH6蛋白的表达缺失与肿瘤发生部位及肿瘤浸润深度相关($P<0.05$);hPMS2蛋白的表达缺失与肿瘤发生部位及肿瘤分化程度相关($P<0.05$)(表2)。

表1 四种MMR蛋白表达缺失与临床病理特征的关系

Table 1 The relationship between the loss of expression of four MMR protein and the clinicopathological features

Pathologic feature		Cases	Loss of expression(n)	Loss rate(%)	χ^2	P
Sexes	Man	103	19	18.4	0.27	0.61
	Woman	74	16	21.6		
Age	≥ 60	132	25	18.9	0.22	0.65
	<60	45	10	22.2		
Location	Left colon	15	7	46.7	29.23	<0.1
	Right colon	46	18	39.1		
	Sigmoid colon	66	9	13.6		
	Rectum	50	1	2		
Shape	Ulcerative	84	10	11.9	6.2	<0.05
	Bulge type	93	25	26.9		
Depth of invasion	Muscular coat	28	3	10.7	16.0	<0.01
	Serous layer	115	17	14.8		
	Subserosal	34	15	44.1		
Degree of differentiation	Well-differentiation	46	7	15.2	25.32	<0.01
	Moderately differentiation	125	22	17.6		
	Poorly differentiation	6	6	100		
Lymph node metastasis	Yes	96	17	17.7	0.56	0.48
	No	81	18	22.2		
Distant metastasis	Yes	36	4	11.1	1.51	0.28
	No	141	31	22		

表 2 hMLH1,hMSH2,hMSH6 和 hPMS2 表达缺失与临床病理参数间的关系

Table 2 The relationship between the loss of expression of hMLH1, hMSH2, hMSH6 and hPMS2 and the clinical pathological parameters

Items		Cases	hMLH1			hMSH2			hMSH6			hPMS2		
			Loss of expression	x ²	P	Loss of expression	x ²	P	Loss of expression	x ²	P	Loss of expression	x ²	P
Sexes	Man	103	5	0.78	0.37	3	0.2	0.65	2	0.08	0.77	9	0.23	0.63
	Woman	74	6			4			1			5		
Age	≥ 60	132	8	0.4	0.83	5	0.6	0.85	3	0.12	0.73	9	0.85	0.36
	<60	45	3			2			0			5		
Loca- tion	Left colon	15	1	14.33	<0.013	3	11.72	<0.01	2	13.86	<0.01	1	10.01	0.04
	Right colon	46	8			2			0			8		
	Sigmoid colon	66	2			1			1			5		
	Rectum	50	0			1			0			0		
Shape	Ulcerative	84	3	1.15	0.28	2	0.4	0.53	0	1.16	0.28	5	0.84	0.36
	Bulge type	93	8			5			3			9		
Depth of inva- sion	Muscular coat	28	1	2.33	0.31	0	3.34	0.18	1	6.15	0.04	4	0.67	0.25
	Serous layer	115	6			4			0			3		
	Subserosal	34	4			3			2			6		
Degree of differ- entia- tion	Well-differen- tiation	46	2	7.92	0.02	1	2.94	0.23	1	0.17	0.92	3	15.11	<0.01
	Moderately differentiation	125	7			5			2			8		
	Poorly differentiation	6	2			1			0			3		
Lymph node metas- tasis	Yes	86	5	0.36	0.55	4	0.05	0.82	1	0.02	0.88	7	0.11	0.74
	No	81	6			3			2			7		
	Distant metas- tasis	Yes	36			0			2			1		
	No	141	11	1.81	0.17	5	0.01	0.94	2	0.03	0.87	13	0.87	0.35

3 讨论

内外多种因素导致机体细胞出现癌变,结直肠癌从发生到发展均很复杂,多种基因参与其中,其中主要的病理机制包括激活原癌基因、抑制抑癌基因的活性和 MMR 的突变以及基因启动子甲基化等^[3]。多种生物体中均存在错配修复系统,基本组成单位是一系列的修复 DNA 碱基错配的特有的酶分子,具有纠正基因在复制或重组中出现的异常变化,从而保证完整和稳定的 DNA,维护其正常进程^[4]。错配修复基因的种系突变是遗传性非息肉病性大肠癌(HNPCC)的遗传学病因之一^[5]。还有学者证实^[6],MMR 蛋白的表达缺失对于散发性结直肠癌(SCRC)的发生和发展产生影响。一旦 MMR 基因发生突变,其修复错配功能丧失,正常细胞出现异常增殖和分化,进而出现肿瘤^[7]。Huh 等^[8]研究发现,结直肠癌患者的临床病理特征影响 MMR 蛋白表达缺失,对于诊疗结直肠癌的意义重大。

研究中从四种 MMR 的表达情况来判断结直肠癌患者组织中错配修复基因突变的现象。有研究发现^[9],肿瘤的分化程度影响 hMLH1 和 hMSH2 蛋白的表达缺失,具体来说,肿瘤分化程度越低,这两种蛋白表达缺失现象加重,表明低分化程度的

结直肠癌中 MMR 的缺失表达现象较多,进而加重肿瘤的严重程度。另外,其他研究发现 hMLH1 和 hMSH2 蛋白与肿瘤分化程度和发生部位密切联系^[10],以上两个结果推测出结论:联合检测 hMLH1 和 hMSH2 蛋白的表达情况可以对散发性直肠癌的诊断提供理论依据。本研究中检测的 177 例结直肠癌组织中 hMLH1, hMSH2, hMSH6 和 hPMS2 的表达,发现四种错配修复蛋白表达的缺失均与肿瘤发生部位相关;而 hMLH1 与 hPMS2 蛋白的表达缺失均与肿瘤发生部位及肿瘤分化程度相关,提示可能 MMR 的缺失表达现象在低分化的结直肠癌组织较多,加重肿瘤的恶化程度;hMSH6 蛋白的缺失与肿瘤发生部位及浸润深度相关,提示可能随着癌组织侵犯的范围越大,错配修复基因的缺失越多。本文的研究结果与上述文献报道大致相符。本研究还显示,错配修复蛋白的表达与淋巴结转移和远处转移无明显相关,MMR 的突变现象只在肿瘤的开始阶段存在,肿瘤的浸润和转移并不会对其造成影响,类似的结果在其他学者的研究^[11,12]中也可以发现。另外,在错配修复基因蛋白的总缺失率中,有 54.3%出现两个以上蛋白的缺失,这可能与微卫星不稳定性(MSI)相关。错配修复功能缺陷是产生微卫星不稳定的原因^[13]。因为 MSI-H 的定义为至少 2 个微卫星标志物(40%)改

变。散发性 MSI-H CRC 的微卫星改变较 Lynch 综合征 CRC 广泛^[14,15]。最后,四种错配修复蛋白发生突变从而导致部分错配修复功能缺失,继而引发肿瘤^[16-18]。在大多数国内文献中,以研究 hMLH1 和 hMSH2 这两种蛋白居多,且两者的表达情可以预测微卫星不稳定(MSI)的存在,而相当数量的研究证实 MSI 有利于预后^[19,20]。本文对 hMLH1,hMSH2,hMSH6 和 hPMS2 四种蛋白都做了研究分析,希望能为临床提供更多的对比与参考数据。而四种错配修复基因蛋白失表达情况与临床参数间的明确关系则有待于收集更多病例组织以及作进一步的研究加以证实。

综上所述,错配修复蛋白的表达在部分结直肠癌组织中出現缺失现象,且与肿瘤部位及分化程度密切相关。诱发结直肠癌的重要原因可能是 hMLH1、hMSH2、hMSH6 和 hPMS2 表达的缺失,通过检测其在结直肠癌患者中的表达缺失情况,且有可能为结直肠癌的临床治疗提供有价值的参考依据。

参考文献(References)

- [1] Silva VW, Askan G, Daniel TD, et al. Biliary carcinomas: pathology and the role of DNA mismatch repair deficiency[J]. Chin Clin Oncol, 2016, 5(5): 62
- [2] 许良中,杨文涛.免疫组织化学反应结果的判断标准[J].中国癌症杂志, 2006, 6(1): 4
Xu Liang-zhong, Yang Wen-tao. The judgment standard of the results of immunohistochemical reaction[J]. China Oncology, 2006, 6(1): 4
- [3] Kotepui M, Piwkham D, Songsri A, et al. Histopathology analysis of benign colorectal diseases and colorectal cancer in Hatyai Hospital, Songkhla, Thailand [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14 (4): 2667-2671
- [4] Ariyoshi M, Morikawa K. A Dual Base Flipping Mechanism for Archaeal Mismatch Repair[J]. Structure, 2016, 24(11): 1859-1861
- [5] Nakae S, Hijikata A, Tsuji T, et al. Structure of the EndoMS-DNA Complex as Mismatch Restriction Endonuclease [J]. Structure, 2016, 24(11): 1960-1971
- [6] Bupathi M, Wu C. Biomarkers for immune therapy in colorectal cancer: mismatch-repair deficiency and others[J]. J Gastrointest Oncol, 2016, 7(5): 713-720
- [7] Rakitin SB, Grigorkina EB, Olenov GV. Analysis of Microsatellite DNA in Rodents from Eastern Urals Radioactive Trace Zone and Contiguous Territories[J]. Genetika, 2016, 52(4): 453-460
- [8] Huh JW, Kim HC, Kim SH, et al. Mismatch Repair Gene Expression as a Predictor of Tumor Responses in Patients with Rectal Cancer Treated With Preoperative Chemoradiation[J]. Medicine (Baltimore), 2016, 95(3): e2582
- [9] Li G, Hu F, Yuan F, et al. Intronic and promoter polymorphisms of hMLH1/hMSH2 and colorectal cancer risk in Heilongjiang Province of China[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2015, 141(8): 1393-1404
- [10] Wang Y, Li G, Hu F, et al. The prognostic significance of polymorphisms in hMLH1/hMSH2 for colorectal cancer[J]. Med Oncol, 2014, 31(6): 975
- [11] 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
- [12] 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
- [13] de Rosa N, Rodriguez-Bigas MA, Chang GJ, et al. DNA Mismatch Repair Deficiency in Rectal Cancer: Benchmarking Its Impact on Prognosis, Neoadjuvant Response Prediction, and Clinical Cancer Genetics[J]. J Clin Oncol, 2016, 34(25): 3039-3046
- [14] Lee V, Murphy A, Le DT, et al. Mismatch Repair Deficiency and Response to Immune Checkpoint Blockade[J]. Oncologist, 2016, 21(10): 1200-1211
- [15] Sun L, Zhang Y, Zhang Z, et al. Preferential Protection of Genetic Fidelity within Open Chromatin by the Mismatch Repair Machinery[J]. J Biol Chem, 2016, 291(34): 17692-17705
- [16] Merok MA, Ahlquist T, Royrvik EC, et al. Microsatellite instability has a positive prognostic impact on stage II colorectal cancer after complete resection: results from a large, consecutive Norwegian series [J]. Ann Oncol, 2013, 24(5): 1274-1282
- [17] 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
- [18] Walker CJ, Miranda MA, O'Hern MJ, et al. MonoSeq Variant Caller Reveals Novel Mononucleotide Run Indel Mutations in Tumors with Defective DNA Mismatch Repair [J]. Hum Mutat, 2016, 37 (10): 1004-1012
- [19] Quiroga D, Lysterly HK, Morse MA. Deficient Mismatch Repair and the Role of Immunotherapy in Metastatic Colorectal Cancer [J]. Curr Treat Options Oncol, 2016, 17(8): 41
- [20] 宋颖韬,周晓燕,孙长生,等.错配修复蛋白 hMSH2、hMLH1 在涎腺粘液表皮样癌中的表达 [J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(10): 1839-1843
Song Ying-tao, Zhou Xiao-yan, Sun Chang-sheng, et al. Expression of hMLH1, hMSH2 in Salivary Gland Mucoepidermoid Carcinoma[J]. Progress in Modern Biomedicine, 2014, 14(10): 1839-1843