

[文章编号] 1007-385X(2007)02-0169-04

· 论 著 ·

hMLH1 蛋白在食管鳞状细胞癌和不典型增生组织中的表达

贾 瑞, 陈志涛, 王丹云, 孙志钢, 王宗明, 杨长征 (山东大学临床医学院 济南市中心医院, 济南 250013)

[摘 要] **目的:** 探讨同一食管癌患者食管的鳞状细胞癌组织、不典型增生组织、正常鳞状上皮组织中错配修复基因 1 (human mutl homolog 1, *hMLH1*) 的蛋白表达情况, 深入研究它与食管鳞状细胞癌发生发展的关系。**方法:** 取 92 例食管鳞状细胞癌患者的病变组织, 其病理切片中鳞状细胞癌组织、不典型增生组织和正常鳞状上皮组织均存在, 采用免疫组织化学的方法, 检测 hMLH1 蛋白在 3 种不同组织中的表达, 并分析其与性别、年龄、分化程度、浸润深度、肿瘤分期、淋巴结转移等临床病理参数之间的关系。**结果:** hMLH1 蛋白在食管鳞状细胞癌组织、不典型增生组织、正常鳞状上皮组织细胞核中的阳性表达率分别为 36.96%、56.52%、84.78%, 鳞状细胞癌组织和不典型增生组织均显著低于正常食管鳞状上皮组织 ($P < 0.01$)。鳞状细胞癌组织中 hMLH1 蛋白表达阴性者, 年龄较阳性者大 ($P < 0.05$); hMLH1 蛋白表达与肿瘤分期、淋巴结转移等有明显相关性 ($P < 0.05$)。**结论:** *hMLH1* 基因缺失可能在早期就参与了食管鳞状细胞癌的发生过程, hMLH1 蛋白可能抑制或延缓食管鳞状细胞癌的发生和发展。

[关键词] 食管肿瘤; 鳞状细胞癌; 不典型增生; 错配修复基因 1; 免疫组织化学

[中图分类号] R735.1 [文献标志码] A

hMLH1 protein expression in esophagus squamous cell carcinoma, esophagus atypical hyperplasia, and normal esophagus tissues

JIA Rui, CHEN Zhi-tao, WANG Dan-yun, SUN Zhi-gang, WANG Zong-ming, YANG Chang-zheng (Jinan Central Hospital, Medical College, Shandong University, Jinan 250013, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the expression of hMLH1 protein in esophagus squamous cell carcinoma, atypical hyperplasia tissue and normal esophagus tissue, so as to discuss the relationship between *hMLH1* expression and esophagus carcinogenesis. **Methods:** The specimens of esophagus squamous cell carcinoma, atypical hyperplasia and normal esophagus tissue were obtained from 92 esophagus carcinoma patients. Immunohistochemistry (IHC) staining technique was used to detect expression of hMLH1 protein. The relationship between hMLH1 expression with clinical parameters, such as gender, age, cancer differentiation level, infiltration depth, tumor stage, lymphatic metastasis, was analyzed. **Results:** The positive rates of hMLH1 protein in esophagus squamous cell carcinoma, and atypical hyperplasia tissue and normal esophagus tissue were 36.96%, 56.52%, and 84.78%, respectively, with the former 2 significantly lower than the latter ($P < 0.01$). The average age of patients negative of hMLH1 protein in tumor tissues was older than that of patients positive of hMLH1 ($P < 0.05$). There was significant correlation between the expression of hMLH1 with tumor staging and lymphatic metastasis ($P < 0.05$). **Conclusion:** Deletion of hMLH1 may participate in the carcinogenesis of esophageal squamous cell carcinoma at an early stage. *hMLH1* gene may delay and suppress the development and progression of esophageal squamous cell carcinoma.

[Key words] esophageal neoplasms; squamous cell carcinoma; atypical hyperplasia; human mutl homolog 1 gene; immunohistochemistry

[Chin J Cancer Biother, 2007, 14(2): 169-172]

食管癌(esophageal carcinoma, EC)是我国常见的恶性肿瘤之一, 其发病机制至今没有完全阐明。有许多研究证明, 个体遗传易感因素在食管癌的发病中起重要作用。食管癌细胞中, 有许多染色体畸变和癌基因、抑癌基因的突变^[1], 表明致癌因素引

起 DNA 损伤是食管癌发生和发展的重要因素, 同时

[作者简介] 贾 瑞(1976-), 男, 河南洛阳人, 硕士研究生, 主要从事食管肿瘤方面的研究

[通讯作者] 杨长征, E-mail: ycz666@126.com

也提示 DNA 修复能力的差异可能是导致个体对食管癌易感性不同的原因之一。近年来,随着分子生物学的发展,个体的遗传易感因素在食管癌的发生、发展中的作用越来越受到重视,其中 DNA 损伤修复基因正在成为研究的一个热点^[24]。DNA 损伤修复方式主要有以下 4 种:碱基切除修复,核苷酸切除修复,双链断裂修复,错配修复(mismatch repair, MMR)。每一种修复方式都可能有多种分子参与。

MMR 基因系统是维持基因组稳定性的核心机制之一^[5],而错配修复基因 1(human mutl homolog 1, hMLH1)是该系统中的重要成员^[6]。在国内外,有关食管鳞状细胞癌的研究中,hMLH1 的缺陷已有不少报道,其在不典型增生组织中、正常鳞状上皮组织中的研究对比则偶有报道。本研究对 92 例食管鳞状细胞癌组织及其相应的不典型增生组织、正常食管鳞状上皮组织进行免疫组织化学(Immunohistochemistry, IHC)染色,分别对它们的 hMLH1 蛋白表达情况进行检测和分析。

1 材料与方法

1.1 组织标本

随机选择济南市中心医院 2001 年 6 月至 2005 年 12 月食管鳞状细胞癌病例手术标本的石蜡包埋组织,患者术前未经放、化疗,且全部标本的病理切片均经两位以上病理学专家证实;要求其病理切片中,存在鳞状细胞癌组织、不典型增生组织和正常食管鳞状上皮组织。鳞癌组织选材于癌组织中质地均匀、且无出血坏死处;不典型增生组织选取于癌旁组织;正常食管鳞状上皮组织一般选取于手术远端切缘,三者均经镜下确认。92 例中,男性 58 例,女性 34 例。平均年龄(58.15 ± 8.20)岁。经病理检查确诊,其中分化程度 I 级(高分化)12 例, II 级(中度分化)62 例, III 级(低分化)18 例。浸润深度侵及黏膜下 10 例,侵及浅肌层 24 例,深肌层 32 例,侵达纤维膜 26 例。食管癌分期(TNM 分期) I 期 11 例, II 期 58 例, III 期 23 例, IV 期 0 例。有淋巴结转移 64 例,病理未见淋巴结转移 28 例。

1.2 主要试剂

hMLH1 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司(原装进口)。免疫组化染色超敏试剂盒(S-P 法)和 DAB 显色试剂盒均购自北京中山生物公司。

1.3 免疫组织化学染色

常规石蜡包埋的组织制成 5 μm 的连续切片,采用高压锅抗原修复,染色过程按试剂盒说明书进行;抗体稀释至 1:200,取已知阳性组织作阳性对

照, PBS 替代一抗作阴性对照。DAB 染色,苏木精复染,最后中性树胶封片。

1.4 结果判断标准

光学显微镜下,免疫组化阳性信号为棕黄色颗粒,出现在细胞核中,伴或不伴少量的细胞质染色。在每一切片中,选取 10 个高倍视野进行计数,每个视野计数 100 个细胞。着色阳性细胞率 > 20% 定为阳性表达, < 20% 定为阴性表达^[7]。

1.5 统计学处理

所有数据均经 SPSS 14.0 统计软件进行统计学处理,采用 χ^2 检验和 *t* 检验。

2 结果

2.1 hMLH1 蛋白在各食管组织的表达情况

在正常食管鳞状上皮组织中,阳性信号定位于细胞核,呈棕黄色颗粒,出现于大部分黏膜上皮;虽然有部分病例同时出现细胞质着色(即呈现为核浆型),但其着色较浅,且分布均匀(图 1A)。在食管鳞状细胞癌组织及其不典型增生组织中,也有部分病例出现核浆型,但着色较深,分布不均匀;阳性细胞以上皮基底层较为密集,阳性信号也定位于细胞核(图 1B, C)。

正常食管鳞状上皮组织、不典型增生组织、鳞状细胞癌组织 3 者之间,在细胞核阳性表达分别为 84.78%、56.52%、36.96%,经卡方检验有统计学差异($\chi^2 = 44.12, P < 0.01$, 表 1)。

表 1 不同食管组织中 hMLH1 蛋白的表达情况

Tab.1 hMLH1 protein expression in different esophagus tissues

Groups	Positive in nucleus		Positive in cytoplasm	
	<i>n</i>	Rate (%)	<i>n</i>	Rate (%)
Normal esophagus	78	84.70	8	88.70
Atypical hyperplasia	52	56.52	30	32.61
Squamous cell carcinoma	34	36.96 **	38	41.30 $\Delta\Delta$

** $P < 0.01$ vs normal esophagus or atypical hyperplasia; $\Delta\Delta P < 0.01$ vs normal esophagus

2.2 食管鳞癌组织中 hMLH1 蛋白表达与临床病理参数之间的关系

鳞癌组织中细胞核 hMLH1 蛋白表达阳性病例的平均年龄为(57.88 ± 5.51)岁;hMLH1 蛋白表达阴性病例的平均年龄为(61.21 ± 6.81)岁,后者的发病年龄较大($P < 0.05$)。鳞癌组织细胞核中 hMLH1 蛋白表达与性别、浸润深度、分化程度等无关,但与肿瘤分期和淋巴结转移有明显相关(表 2)。

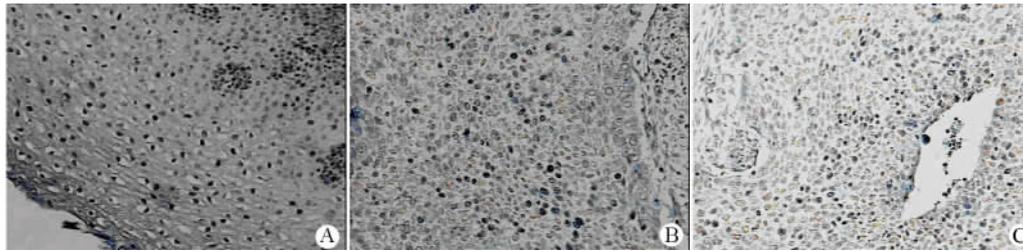


图 1 不同食管组织中 hMLH1 蛋白的表达(S-P, ×100)

Fig. 1 hMLH1 protein expression in different esophagus tissues (S-P, × 100)

A: Normal esophagus tissue; B: Atypical hyperplasia tissue, hMLH1 was expressed in nucleus and in the cytoplasm of some cells; C: Esophagus squamous cell carcinoma, hMLH1 was expressed in nucleus and cytoplasm

表 2 食管鳞状细胞癌组织中 hMLH1 蛋白的表达与临床病理参数的关系

Tab. 2 Relationship between expression of hMLH1 protein and clinical parameters of esophagus squamous cell carcinoma tissues

Item	Groups	n	Positive number	Rate (%)	P
Gender	Male	58	22	37.93	0.80
	Female	34	12	35.29	
Infiltration depth	Inferior mucous membrane	10	4	40.00	0.87
	Superficial muscular layer	24	10	41.67	
	Deep muscular layer	32	12	37.50	
	Fibrous membrane	26	8	30.77	
Differentiation level	Poorly differentiated	18	6	33.33	0.88
	Midrange differentiated	62	24	38.71	
	Well-differentiated	12	4	33.33	
Staging of tumor (TNM)	I stage	11	7	63.64	0.03
	II stage	58	23	39.66	
	III stage	23	4	17.39	
Lymphatic metastasis	Yes	64	19	29.69	0.03
	No	28	15	53.57	

3 讨论

hMLH1 是 1994 年 Bronner 等^[8]在研究“遗传性非息肉形成性结直肠癌(hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC)”的过程中发现的。目前已知的人类错配修复基因有 9 种,包括与大肠杆菌 MutL 同源的 *hMLH1*、*hPMS1*、*hPMS2* 等 3 个基因和与大肠杆菌 MutS 同源的 *hMSH2*、*GTBP*、*hMSH3*、*hMSH4*、*hMSH5*、*hMSH6* 等 6 个基因^[9-10]。在碱基错配修复过程中,*hMLH1* 蛋白与 *hPMS2* 蛋白协同,发挥着解旋及切开错配碱基的关键作用^[10]。*hMLH1* 的突变主要分为点突变和移码突变,70% 的突变因形成终止密码导致翻译过早终止,从而产生不全的 *hMLH1* 蛋白^[11]。究竟是何原因导致了食管鳞癌 *hM-*

LH1 基因的突变或其表达产物的缺失,至今尚无定论。但有不少的研究^[12]证实,*hMLH1* 基因启动子的甲基化是重要原因。虽然该甲基化大多发生在基因 5'端 CpG 岛(正常状态下未甲基化的富含 CpG 的序列)的核苷酸的胞嘧啶上^[13-14],但有关食管鳞癌这种现象的发生尚未见报道。

在正常食管鳞状上皮组织中,*hMLH1* 蛋白主要表达在上皮基底层细胞的细胞核,这提示了 *hMLH1* 蛋白作为 MMR 蛋白的纠错功能及其存在的必要性。在不典型增生组织和食管鳞癌组织中,*hMLH1* 蛋白在细胞核中的表达明显下降,这表明以 *hMLH1* 为代表的错配修复缺陷,不仅在食管鳞癌的发展中起一定作用,而且在不典型增生等食管鳞癌的早期发生中就已经存在。有研究^[15]表明,在不典型增生

或肿瘤等不成熟的复制活跃的细胞中,需要 MMR 蛋白不断纠错,并且这种作用贯穿于整个细胞周期。本研究中还发现正常食管鳞状上皮细胞中部分细胞的细胞质,着色较浅,分布均匀;在食管不典型增生上皮和鳞状细胞癌组织中,着色则较深,且分布不均匀。这可能是作为一种伴随现象,提示了蛋白的合成部位。另外按正常食管鳞状上皮组织、不典型增生组织、鳞状细胞癌组织的发生发展顺序,伴随着 hMLH1 蛋白在细胞核中表达阳性率下降,胞质表达阳性率却增加。这与可能存在的转位异常有关。

本研究在对各临床病理参数的分析中发现了以下特点:其一,鳞癌组织中 hMLH1 蛋白细胞核表达阴性患者的年龄较表达阳性者大,在一定程度上证明了 hMLH1 蛋白在抑制和延缓肿瘤发生上所发挥的作用;其二,hMLH1 蛋白在食管鳞状细胞癌组织中的表达与临床分期和淋巴结转移有关,与细胞分化程度及癌组织浸润深度无关,但对此尚存争议。Tzao 等^[12]研究了 60 例食管鳞癌标本,发现 43 例 hMLH₁ 基因缺失,占 72%;有 39 例 hMSH₂ 缺失,占 65%;hMLH₁ 基因的蛋白表达产物与肿瘤分期、浸润深度、淋巴结转移等有关,而与远端转移无明显相关,而 hMSH₂ 基因的蛋白表达产物未发现与上述参数明显相关。但 Uehara 等^[16]研究了 122 例食管鳞癌患者,发现 hMLH₁ 和 hMSH₂ 蛋白均表达阳性的为 73 例(占 59.8%),hMLH₁ 或者 hMSH₂ 蛋白表达阴性的为 35 例(占 28.7%),hMLH₁ 和 hMSH₂ 蛋白均表达阴性的为 14 例(占 11.5%),且 hMLH₁ 和(或)hMSH₂ 蛋白表达阴性与食管鳞癌的低分化无关($P=0.099$),但与其广泛浸润($P=0.0007$)、淋巴结转移($P=0.0056$)有关。

综上所述,以 hMLH₁ 为代表的错配修复基因的缺失,在早期就参与了食管鳞状细胞癌的发生过程;hMLH₁ 基因可能抑制或延缓食管鳞状细胞癌的发生和发展。临床检测 hMLH1 蛋白的表达,可作为食管癌高发区易感人群普查、筛检的一个较为重要的生物学标志,为食管癌的早期预防服务。

[参 考 文 献]

[1] Lu SH. Alterations of oncogenes and tumor suppressor genes in esophageal cancer in China[J]. Mutat Res, 2000, 462(2-3): 343-353.
[2] Hayashi M, Tamura G, Jin Z, et al. Microsatellite instability in esophageal squamous cell carcinoma is not associated with hMLH1

promoter hypermethylation[J]. Pathol Int, 2003, 53(5): 270-276.

- [3] Huang D, Chen C, Sun W, et al. High-throughput gene sequencing assay development for hereditary nonpolyposis colon cancer [J]. Clin Colorectal Cancer, 2004, 4(4): 275-279.
[4] Casson AG, Zheng Z, Evans SC, et al. Polymorphisms in DNA repair genes in the molecular pathogenesis of esophageal (Barrett) adenocarcinoma[J]. Carcinogenesis, 2005, 26(9): 1536-1541.
[5] Park DL, Park SH, Kim SH, et al. Effect of Helicobacter pylori infection on the expression of DNA mismatch repair protein[J]. Helicobacter, 2005, 10(3): 179-184.
[6] Ellison AR, Lofing J, Bitter GA. Human mutl homolog (MLH1) function in DNA mismatch repair : A prospective screen for missense mutations in the ATPase domain[J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(18): 5321-5338.
[7] 张军航,马琳,刘颜寿,等. hMLH1 基因在食管癌组织中的表达及临床意义[J]. 实用肿瘤学杂志, 2001, 15(3): 173-174.
[8] Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, et al. Mutations in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with HNPCC[J]. Nature, 1994, 368 (6468): 258-261.
[9] Wang CF, Zhou XY, Zhang TM, et al. Detection of germline mutations of hMLH1 and hMSH2 based on cDNA sequencing in China [J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(42): 6620-6623.
[10] Kunkel TA, Erie DA. DNA mismatch repair[J]. Annu Rev Biochem, 2005, 74: 681-710.
[11] Liu T, Tannergard P, Hackman P, et al. Missense mutations in hMLH1 associated with colorectal cancer[J]. Hum Genet, 1999, 105(5): 437-441.
[12] Tzao C, Hsu HS, Sun GH, et al. Promoter methylation of the hMLH1 gene and protein expression of human mutl homolog 1 and human muts homolog 2 in resected esophageal squamous cell carcinoma[J]. J Thorac Cardiovascular Surgery, 2005, 130(5): 1371-1777.
[13] Noda H, Kato Y, Yoshikawa H, et al. Microsatellite instability caused by hMLH1 promoter methylation increases with tumor progression in right-sided sporadic colorectal cancer[J]. Oncology, 2005, 69(4): 354-362.
[14] Tamura G. Alterations of tumor suppressor and tumorrelated genes in the development and progression of gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(2): 192-198.
[15] Meyers M, Theodosiou M, Acharya S, et al. Cell cycle regulation of the human DNA mismatch repair genes hMSH2, hMLH1, and hPSH2[J]. Cancer Res, 1997, 57(2): 206-208.
[16] Uehara H, Miyamoto M, Kato K, et al. Deficiency of hMLH1 and hMSH2 expression is a poor prognostic factor in esophageal squamous cell carcinoma[J]. J Surg Oncol, 2005, 92(2): 109-115.

[收稿日期] 2006 - 12 - 11 [修回日期] 2007 - 03 - 20

[本文编辑] 郁晓路