DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.07.025
第26卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 7
620 2004年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)07-620-04

大肠腺瘤及其癌变错配修复基因 hMLH1 和 hMSH2 表达与细胞增殖的关系

周 琪,阎晓初,辛 榕,段光杰,章 容,柳凤轩 (第三军医大学西南医院病理科,重庆 400038)

提 要:目的 探讨错配修复基因 hMLH1 和 hMSH2 表达在大肠癌发生中的作用及其与细胞增殖间的关系。方法 采用免疫组织化学染色法对 63 例大肠腺瘤、20 例腺瘤癌变和 20 例大肠癌的 hMLH1 和 hMSH2、PCNA 和 Ki-67 表达进行检测。结果 大肠腺瘤、癌变和大肠癌中 hMLH1、hMSH2 阳性表达率逐渐降低,与正常大肠粘膜相比相差显著($P<0.01$),腺瘤不典型增生分级增加其阳性率亦逐渐降低。腺瘤不典型增生Ⅱ、Ⅲ级、腺瘤癌变和大肠癌中 $hMSH2^-$者,其 PCNA LI 显著低于 $hMSH2^+$者($P<0.05$);hMSH2 表达缺失的大肠癌,其 Ki-67 LI 较阳性者显著降低($P<0.05$)。3 组大肠病变 hMLH1 阳性与阴性表达组间,其 PCNA LI 和 Ki-67 LI 无差异显著性。结论 提示错配修复基因突变或功能缺失与大肠癌的发生有关,可能系大肠癌发生过程中的早期事件,并对大肠肿瘤细胞增殖活性有所影响。

关键词:大肠腺瘤;错配修复基因;细胞增殖;免疫组化
中图法分类号:R329.28;R394.2;R735.34 文献标识码:A

Relationship of mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2 expression with cell proliferation in colorectal adenomas

ZHOU Qi, YAN Xiao-chu, XIN Rong, DUAN Guang-jie, ZHANG Rong, LIU Feng-xuan (Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To explore the roles of hMLH1 and hMSH2 in the genesis and progression of colorectal carcinomas (CRCs) and their effects on cell proliferation activity. **Methods** The expression of mismatch repair genes hMLH1 and hMSH2, PCNA and Ki-67 in 63 cases of colorectal adenoma, 20 cases of adenoma with malignant change, and 20 cases of colorectal carcinoma was detected by immunohistochemistry. **Results** The positive rate of hMLH1 and hMSH2 in colorectal adenoma, adenoma with malignant change, and CRC was significantly lower than that in normal intestinal mucosa ($P<0.01$). With the increase of dysplasia in adenomas, the positive expression rate of hMLH1 and hMSH2 proteins decreased gradually. The PCNA label index of tumors with over-expressed hMSH2 was significant higher than that of the tumors with negative hMSH2 in colorectal adenomas with malignant change and CRCs ($P<0.05$). PCNA labelling index of tumors with over-expressed hMSH2 was significant higher than that of tumors with negative hMSH2 in adenomas with grades Ⅱ and Ⅲ dysplasia ($P<0.05$). Ki-67 labelling index of CRCs with defective hMSH2 was significant lower than that of tumors with overexpression of hMSH2 ($P<0.05$). The changes of PCNA and ki-67 labelling index in colorectal adenomas, adenomas with malignant change, and CRCs were not associated with the expression of hMLH1. **Conclusion** Mismatch repair genes mutation and abnormal function of DNA mismatch repair may participate in the carcinogenesis of CRCs, and might be an early event in carcinogenesis of CRCs. The decreased proliferation activity in colorectal neoplasms might be related to mutation and defect of mismatch repair genes.

Key words: colorectal adenoma; mismatch repair gene; proliferation; immunohistochemistry

大肠癌(colorectal carcinomas, CRCs)系我国常见的恶性肿瘤之一。研究表明错配修复(mismatch repair, MMR)基因突变和功能异常,造成 DNA 复制精确性降低,发生复制错误(replication error, RER)和微卫星不稳定性(microsatellite instability, MSI),是导致大肠癌发生的重要途径,其中 hMLH1、hMSH2 具有重要的作用[1]。然而有关 MMR 基因在大肠腺瘤及其癌变中的表达,迄今研究报道甚少[2],并且错配修复基因改变与

作者简介:周 琪(1969-),男,重庆市垫江人,硕士,主治医师,主要从事大肠肿瘤病理方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)72257478
通信作者:阎晓初,电话(023)68754432
收稿日期:2003-07-10;修回日期:2004-02-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

细胞增殖的关系, 目前仍不十分清楚。本研究采用免疫组织化学染色法对大肠腺瘤及其癌变和大肠癌组织中错配修复基因 hMLH1 和 hMSH2 的蛋白表达进行检测, 同时检测其 PCNA 和 Ki-67 的表达, 以探讨错配修复基因 hMLH1、hMSH2 在大肠腺瘤癌中的作用及其与细胞增殖的关系。

1　材料与方法

1.1　标本来源

收集我院 1995—2002 年手术切除及肠镜活检的大肠腺瘤及其癌变 83 例, 选择大肠癌 20 例, 正常大肠粘膜 11 例作对照。83 例大肠腺瘤及其腺瘤癌变中, 男性 49 例, 女性 34 例; 年龄最小者 20 岁, 最大者 75 岁, 平均年龄 55.01 岁; 部位: 右半结肠 14 例, 左半结肠 69 例; 组织学类型: 管状腺瘤 15 例, 绒毛状腺瘤 27 例, 管状绒毛状腺瘤 41 例; 不典型增生分级: Ⅰ级 23 例, Ⅱ级 23 例, Ⅲ级 17 例, 癌变 20 例。大肠中分化管状腺癌 20 例, 男性 8 例, 女性 12 例, 年龄 38~72 岁, 平均 56.6 岁。其中右半结肠 13 例, 左半结肠 7 例。所有标本均经 10% 中性福尔马林液固定, 石蜡包埋, 连续切片, 厚度 3~5 μm, 行 HE 染色和免疫组化染色。

1.2　免疫组化染色

采用 Envision™ 法, 一抗 hMLH1(1∶100)、hMSH2(1∶100)、PCNA(即用型)和 Ki-67(即用型), 分别购自武汉博士德公司、美国 Ongene 公司和福州迈新公司。Envision™ 试剂盒为丹麦 Dako 公司产品。hMLH1、hMSH2 采用微波抗原修复。每批染色均设立阳性对照、替代实验和阴性对照。

1.3　结果判定

hMLH1 和 hMSH2 阳性反应主要定位于胞核, 偶可见于胞浆和胞膜。根据阳性细胞数和染色强度, 分别记为: 阳性细胞数 <5% 为阴性, 5%~25% 为 1 分, 26%~50% 为 2 分, 51%~75% 为 3 分, 75% 以上为 4 分。阳性强度以淡黄色为 1 分, 黄色为 2 分, 棕黄色为 3 分。两者相乘, 1~4 分为弱阳性(+), 5~8 分为阳性(++), 9~12 分为强阳性(+++)。PCNA 和 Ki-67 采用标记指数(labeling index, LI): 在 40 物镜下, 计数 1 000 个细胞中 PCNA 和 Ki-67 阳性细胞数, 求出平均每 100 个细胞中的阳性细胞数, 分别记为 PCNA LI 和 Ki-67 LI。

1.4　统计学处理

采用 SPSS11.0 软件分别进行 χ^2 检验和单因素方差分析。

2　结果

2.1　大肠腺瘤及其癌变错配修复基因 hMLH1、hMSH2 蛋白表达

正常大肠、大肠腺瘤、癌变和大肠癌 hMLH1 和 hMSH2 呈不同程度的表达(表 1)。正常大肠粘膜上皮细胞均呈阳性, 其中 hMLH1 以阳性和弱阳性表达为主, hMSH2 以阳性和强阳性表达为主。腺瘤组织中 hMLH1 和 hMSH2 多呈弥漫性表达, 部分区域呈灶性表达增强(图 1, 2), 腺瘤癌变和大肠癌组织中多为灶性表达。3 组病变 hMLH1、hMSH2 阳性率与正常大肠粘膜差异显著($P<0.01$), 其中大肠癌 hMLH1 和 hMSH2 蛋白表达率显著低于大肠腺瘤组和腺瘤癌变组($P<0.01$)。腺瘤不典型增生中, Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ级 hMLH1 阳性率分别为 82.6%(19/23)、82.6%(19/23)、82.35%(14/17), 各级间 hMLH1 阳性率无显著差异($P>0.05$); hMSH2 阳性率分别为 86.96%(20/23)、69.57%(16/23)、64.71%(11/17), 腺瘤不典型增生Ⅰ级组与Ⅱ级、Ⅲ级组间差异显著($P<0.05$)。

表 1　正常大肠、大肠腺瘤、癌变及大肠癌 **hMLH1**、**hMSH2** 表达(%)

Tab 1　hMLH1 and hMSH2 expression in normal mucosa, colorectal adenomas, malignant changes, and CRCs (%)

Group	*n*	hMLH1					hMSH2				
		−	+	++	+++	Positive rate (%)	−	+	++	+++	Positive rate (%)
Normal mucosa	11	0	11	5	1	100.00	0	2	4	5	100.00
Colorectal adenoma	63	11	52	15	12	82.54 *▲	16	23	20	4	74.60 *▲
Malignant change	20	5	15	8	3	75.00 *▲	6	6	5	3	70.00 *▲
CRCs	20	10	10	3	0	50.00 *	9	6	2	3	55.00 *

*: $P<0.01$, *vs* normal mucosa; ▲: $P<0.01$, *vs* CRCs

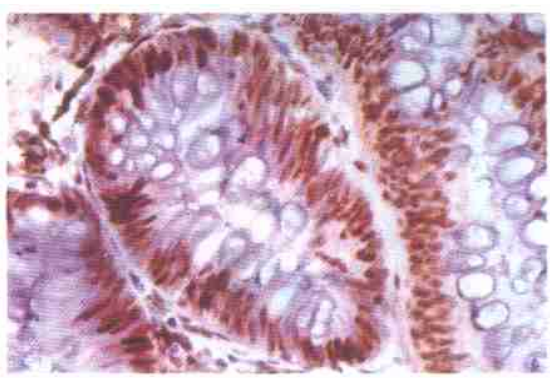


图 1　大肠绒毛状腺瘤不典型增生Ⅰ级, **hMLH1** 呈胞核阳性表达 (Envision™×200)

Fig 1　hMLH1 positive expression in the nucleus of colorectal villous adenoma with grade Ⅰ dysplasia (Envision™×200)



图 2　大肠绒毛状腺瘤不典型增生Ⅱ级, **hMSH2** 呈胞核阳性表达 (Envision™×200)

Fig 2　hMSH2 positive expression in the nucleus of colorectal villous adenoma with grade Ⅱ dysplasia (Envision™×200)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2.2 大肠腺瘤及其癌变 hMLH1、hMSH2 表达与细胞增殖活性比较

2.2.1 hMLH1、hMSH2 表达与 PCNA 标记指数 大肠腺瘤、腺瘤癌变及大肠癌中 $hMLH1^-$ 组 PCNA LI 较 $hMLH1^+$ 组低(表 2),但无显著性差异($P>0.05$)。3 组病变中 $hMSH2^-$ 组也较 $hMSH2^+$ 组 PCNA LI 降低,其中腺瘤癌变和大肠癌 $hMSH2^-$ 者 PCNA LI 均值较 $hMSH2^+$ 者显著降低($P<0.05$)。腺瘤不典型增生Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ级中,$hMLH1^-$ 者 PCNA LI 分别为 17.82±3.77、18.58±3.98、25.86±11.56,$hMLH1^+$ 者 PCNA LI 分别为 19.88±4.43、24.78±5.68、34.6±6.08;经统计学处理各级内,$hMLH1^-$ 与 $hMLH1^+$ 组 PCNA LI 均值无显著性差异($P>0.05$)。腺瘤不典型增生Ⅱ级、Ⅲ级中,$hMSH2^-$ 者 PCNA LI 分别为 19.36±3.27、26.73±9.06,$hMSH2^+$ 者 PCNA LI 分别为 25.11±5.00、34.35±5.20;经统计学处理 $hMSH2^-$ 与 $hMSH2^+$ 组 PCNA LI 均值具有差异显著性($P<0.05$)。

表 2 大肠腺瘤及癌变和大肠癌中 **hMLH1、hMSH2** 表达与 **PCNA LI** 比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Comparison of hMLH1 and hMSH2 expressions with PCNA LI in the colorectal adenomas, malignant changes, and CRCs ($\bar{x}\pm s$)

Histological type	$hMLH1^-$		$hMLH1^+$		$hMSH2^-$		$hMSH2^+$	
	n	$\bar{x}\pm s$	n	$\bar{x}\pm s$	n	$\bar{x}\pm s$	n	$\bar{x}\pm s$
Colorectal adenoma	11	21.92±8.90	52	24.88±8.32	16	22.02±7.17	47	24.98±7.31
Malignant change	5	37.86±9.64	15	41.13±7.20	6	32.28±4.84	14	41.28±9.48▲
CRCs	10	42.18±8.17	10	43.18±10.79	9	36.00±1.73	11	48.82±9.34*

▲: $P<0.05$, *vs* the $hMSH2^-$; *: $P<0.01$, *vs* the $hMSH2^-$

2.2.2 hMLH1、hMSH2 蛋白表达与 Ki-67 标记指数 大肠腺瘤、腺瘤癌变和大肠癌 $hMLH1^-$ 者组 Ki-67 LI 较 $hMLH1^+$ 组低(表 3),但差异不显著($P>0.05$)。大肠腺瘤、腺瘤癌变和大肠癌 hMSH2 阴性组 Ki-67 LI 较阳性组低,但只在大肠癌组有显著性差异($P<0.05$)。腺瘤不典型增生Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ各级中,hMLH1、hMSH2 蛋白表达阴性组较阳性组 Ki-67-LI 降低,但经统计学处理均无差异显著性($P>0.05$)。

表 3 大肠腺瘤及癌变和大肠癌中 **hMLH1、hMSH2** 表达与 **Ki-67-LI** 比较($\bar{x}\pm s$)

Tab 3 Comparison of hMLH1 and hMSH2 expressions with Ki-67 LI in the colorectal adenomas, malignant changes, and CRCs ($\bar{x}\pm s$)

Histological type	$hMLH1^-$		$hMLH1^+$		$hMSH2^-$		$hMSH2^+$	
	n	$\bar{x}\pm s$	n	$\bar{x}\pm s$	n	$\bar{x}\pm s$	n	$\bar{x}\pm s$
Colorectal adenoma	11	18.91±8.26	52	22.49±7.50	16	20.86±8.41	47	23.06±7.97
Malignant change	5	34.15±9.43	15	33.22±11.20	6	26.44±11.55	14	36.65±10.50
CRCs	10	41.55±9.66	10	39.89±12.23	9	32.27±5.11	11	48.91±8.68▲

▲: $P<0.05$, *vs* the $hMSH2^-$

3 讨论

错配修复基因于 1990 年发现并被克隆,其中 hMLH1 和 hMSH2 为错配修复过程中必须参与的基因,具有十分重要的作用。MMR 系统通过修复碱基-碱基错配、插入缺失环和修复 DNA 复制和重组期间产生的异源性错配而维持遗传保真度。MMR 基因的突变导致 MMR 系统的缺陷,可引起广泛的体细胞突变和 DNA 复制错误,MMR 功能缺失也可导致一些抑癌基因突变率的增加和突变的积累而促进肿瘤的发生[3]。本研究显示,hMLH1 和 hMSH2 基因蛋白阳性表达率从正常组织、腺瘤不典型增生、腺瘤癌变到腺癌逐渐降低,提示在腺瘤阶段已经有 MMR 的基因的突变或功能异常,并随其恶性程度的增加,MMR 基因的突变频率也逐渐升高。提示 MMR 基因的突变,尤其是 hMLH1 和 hMSH2 的突变可能是大肠癌发生的早期事件之一。

近年研究表明,MMR 功能缺失引起家族性非息肉病性大肠癌(hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC)和部分散发性大肠癌的发生和发展[3,4]。Gryfe 等[3]报道 MMR 功能缺失所致的 HNPCC 主要表现为 hMSH2 的表达缺失,其表达的缺失与体细胞突变相关,并且这些肿瘤具有较好的生物学行为和预后。Ericaon 等[5]报道 87%的 HNPCC 有 MMR 基因的蛋白表达缺失,其中 hMSH2 表达缺失率为 49%,hMLH1 的表达缺失率为 39%。在散发性结肠癌中也发现有 MMR 系统的功能缺失,尤其是 hMLH1 和 hMSH2 的突变是造成某些散发性结肠癌发生的主要原因。不过在散发性结肠肿瘤中 hMLH1 表达缺失率高于 hMSH2。主要是由于 hMLH1 基因启动子甲基化导致 hMLH1 基因的转录和翻译的静默而出现蛋白的表达缺失与微卫星不稳定性引起[6],表明 hMLH1 基因的突变在散发性结肠癌的发生过程中占有重要的地位。Lindor[7]检测 1114 例散发性大肠癌 hMLH1 和 hMSH2 的表达,发现 228 例出现 hMLH1 表达缺失,98 例出现 hMSH2 的表达缺失,认为免疫组化是快速有效的检测 DNA 错配修复缺陷的方法,敏感度为 92.3%,特异度 100%。本组对大肠腺瘤及其癌变组织的 hMLH1 和 hMSH2 的检测显示两者的表达缺失率相近,推测大肠腺瘤中 hMLH1 和 hMSH2 基因突变可能共同参与了肿瘤的发生,与 Torlakovic 等[2]研究结论相吻合。

肿瘤细胞的增殖活性是决定肿瘤生物学行为的一个重要参数,而增殖活性的测定可以反映肿瘤的恶性程度并预测其生物学行为。目前,国内外关于 MMR 基因蛋白表达与细胞增殖的研究报道较少,结果也不一致。Hamid 等[8]检测 45 例正常子宫内膜,51 例子宫内膜不典型增生和 27 例子宫内膜癌 hMSH2 和 PCNA 的表达,发现 hMSH2 表达缺失者 PCNA 表达减弱。吴保平等[9]采用流式细胞仪、免疫组化检测大肠癌 hM-

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

LH1、hMSH2、PCNA 的表达，发现 hMLH1 和 hMSH2 表达缺失的大肠癌 PCNA LI 降低，而且主要是 S 期百分率显著降低。与我们先前检测 MSI^+ 的大肠癌 PCNA LI 降低[10]的结果相符。也有报道，hMSH2 表达率从乳腺原发癌到转移癌逐渐降低，PCNA 表达却逐渐升高。我们的研究结果显示 hMSH2 蛋白表达缺失的大肠腺瘤癌变和大肠癌 PCNA LI 较 $hMSH2^+$ 者显著降低，腺瘤不典型增生 II、III级组 $hMSH2^-$ 与 $hMSH2^+$ 间 PCNA LI 差异显著。提示 MMR 基因突变或功能缺失在腺瘤阶段已经影响了 PCNA 功能。hMSH2 蛋白表达缺失的大肠腺瘤癌变和大肠癌 Ki-67 LI 也较 $hMSH2^+$ 者降低，但只在 $hMSH2^+$ 的大肠癌 Ki-67 LI 较 $hMSH2^-$ 者有显著差异，可能与错配修复功能缺失和改变只影响 S 期细胞增殖有关。

参考文献：

[1] Jacob S, Praz F. DNA mismatch repair defects: role in colorectal carcinogenesis[J]. Biochimie, 2002, 84(1): 27—47.
[2] Torlakovic E, Skovlund E, Snover D C, *et al*. Morphologic reappraisal of serrated colorectal polyps[J]. Am J Surg Pathol, 2003, 27(1): 65—81.
[3] Gryfe R, Gallinger S. Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and colorectal cancer[J]. Surgery, 2001, 130(11): 17—20.
[4] Wang Y, Friedl W, Lamberti C, *et al*. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: frequent occurrence of large genomic deletions in MSH2 and MLH1 genes[J]. Int J Cancer, 2003, 103(5): 636—641.
[5] Ericson K, Halvarsson B, Nagel J, *et al*. Defective mismatch-repair in patents with mu tiple primary tumours including colorectal cancer[J]. Eur J Cancer, 2003, 39(2): 240—248.
[6] Deng G, Peng E, Gum J, *et al*. Methylation of hMLH1 promoter correlates with the gene silencing with a region-specific manner in colorectal cancer[J]. Br J Cancer, 2002, 86(4): 574—579.
[7] Lindor N M, Burgart L J, Leontovich O, *et al*. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors[J]. J Clin Oncol, 2002, 20(4): 1043—1048.
[8] Hamid A A, Mandai M, Konishi I, *et al*. Cyclical change of hMSH2 protein expression in normal endometrium during the menstrual cycle and its overexpression in endometrial hyperplasia and sporadic endometrial carcinoma[J]. Cancer, 2002, 94(4): 997—1005.
[9] 吴保平，张亚历，张振书，等. 结肠癌微卫星不稳定性与错配修复基因表达及细胞增殖活性关系的研究[J]. 中华消化杂志，2001，21(5)：312—313.
[10] 阎晓初，陈意生，柳凤轩，等. 结直肠癌、结直肠腺瘤微卫星不稳定性检测及其临床意义[J]. 中华病理学杂志，1999，28(2)：97—100.

（编辑 薛国文）

文章编号：1000-5404(2004)07-0623-01

个案与短篇

大田原综合征 2 例报告

Ohtahara syndrome: a report of 2 cases

熊建平，毕延芹，何念海 （第三军医大学西南医院儿科，重庆 400038）

1 病例资料

病例 1：患儿，女性，18 d，因“反复阵发性肢体强直 15 d”入院，系足月剖宫产儿，生后第 3 天出现头颈向右偏斜，颈项和躯干、四肢强直、握拳，同时伴面色暗红、口唇青紫，持续 10 余秒后缓解，此后抽搐反复发生，而以“惊厥待查”转入我科，查头颅 CT 未见异常，经予抗感染、吸氧、鲁米那镇静等治疗 7 d 患儿未再发生抽搐，而嘱出院观察，但于出院后第 3 天又复出现类似抽搐表现，且发作次数频繁，每天多在 10 次以上，持续时间多在 10 s 之内，故再次入院，经复查头颅 CT、MRI 排外缺氧缺血性脑病及颅内出血后行脑电图检查，结果提示有暴发性抑制倾向，确诊为“大田原综合征”，经镇静治疗后患儿抽搐有所减少，但家长考虑到本病预后不良而放弃治疗出院。

病例 2，患儿，男性，8 个月，因“生长发育落后，至今不能抬头”而收住院。系第 1 胎第 1 产，足月剖宫产儿，围生期无窒息和产伤史，但生后第 2 天出现全身强直性抽搐，每次约持续几秒钟，每天发作 3～4 次，行“头颅 CT、脑电图检查”后诊断为“缺氧缺血性脑病”，经综合治疗 2 周后患儿仍频繁抽搐，转诊重庆儿童医院，行“头颅 MRI、脑电图”等检查，诊断“癫痫脑病：大田原综合征”，给予“得巴金、鲁米那、妥泰”口服治疗 25 d，抽搐明显控制出院，出院后仍反复有点头哈腰样小抽动发作，继续同上治疗至今年 4 月份患儿未再抽搐，但发现患儿运动发育明显落后，至今仍不能抬头，不会用手抓东西，也不能翻身、独坐及爬行，故到我院行高压氧治疗。

讨论

大田原综合征（Ohtahara syndrome）是 1974 年由日本大田原

（下转 626 页）

作者简介：熊建平（1971—），男，福建省邵武市人，硕士，主治医师，讲师，主要从事小儿缺氧脑损伤方面的研究。电话：(023)68754400-73098

收稿日期：2003-07-19；修回日期：2004-01-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net