

食管癌组织中hMSH2基因的表达

癌基因、抑癌基因、DNA修复基因这三种基因在肿瘤的发生发展中起重要作用[1][2]。DNA错配修复基因在遗传性非息肉性结肠癌(HNPCC)中的研究比较深入[2]，在其他许多肿瘤中也存在错配修复基因的缺失和突变[4][5]。中国是世界上食管癌发病率和死亡率最高的国家，每年全世界新诊断的30万食管癌患者有一半发生在中国，而河南林县及其相邻的辉县、安阳等地是我国，也是世界上食管癌发病率和死亡率最高的地区[6][7]。hMSH2是发现最早的DNA错配修复基因[3]。为了解食管癌组织中hMSH2的表达情况，作者利用原位杂交方法，检测了食管癌、癌旁及正常食管组织中错配修复基因hMSH2的mRNA表达情况，并结合患者的临床病理资料进行分析。

1 材料和方法

1.1 材料

32例食管癌患者均为2002年10月~2003年5月间郑州大学第一、二附属医院胸外科住院的手术患者。患者术前均未接受放疗、化疗等其他治疗。全部手术切除标本均经2位以上病理学专家诊断证实。其中鳞癌25例、腺癌5例、腺鳞癌2例；男19例、女13例；年龄50~78岁，平均(62.8±7.4)岁；组织学I~II级22例、III~IV级10例；无淋巴结转移23例、有淋巴结转移9例；肿瘤位于上段4例、中段16例、下段12例；肿瘤最大直径<5 cm者17例，≥5 cm者15例；浸润至粘膜1例，浸润至肌层18例，浸润至全层13例。32例标本均在切除后0.5 h内分别在癌灶、癌旁及正常残端取1 cm×1 cm×1 cm大小的组织块，40 g/L多聚甲醛固定，石蜡包埋。

1.2 实验方法

原位杂交试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司，所有操作均按原位杂交试剂盒操作说明书进行。(1)玻片经20 g/L的氨烷基硅烷(APES)处理。(2)石蜡切片厚度为6~8 μm，经常规脱蜡至水，体积分数30% H2O2 1份加蒸馏水10份混合，室温5~10 min以灭活内源性酶，蒸馏水洗3次。(3)切片上滴加柠檬酸新鲜稀释的胃蛋白酶(1 ml 30 g/L柠檬酸加2滴浓缩型胃蛋白酶)，混匀，37 °C消化25 min，PBS洗3×5 min，蒸馏水洗1次。(4)后固定：10 g/L多聚甲醛/0.1 mol/L PBS(pH 7.2~7.6)，含有1 g/L DEPC，室温固定10 min，蒸馏水洗3次。(5)预杂交：杂交盒底部加体积分数20%甘油20 ml以保持湿度，每张切片加预杂交液20 μl，恒温箱40 °C 3 h，吸去多余的液体。(6)杂交：每张切片滴加20 μl杂交液(含探针)，加原位杂交专用盖玻片，恒温箱40 °C过夜。(7)杂交后洗涤：去掉盖玻片，2×SSC洗涤37 °C 2×5 min；0.5×SSC洗涤37 °C 1×15 min；0.2×SSC洗涤37 °C 1×15 min。(8)滴加封闭液37 °C 30 min，甩去多余的液体；滴加生物素化鼠抗地高辛，37 °C 60 min，PBS洗4×5 min；滴加SABC，37 °C 20 min，PBS洗5 min 3次；滴加生物素化过氧化物酶，37 °C 20 min，PBS洗4×5 min。(10)DAB显色：使用DAB显色试剂盒，1 ml蒸馏水加显色剂A、B、C各1滴，加至标本上，显色20 min，充分水洗。(10)酒精脱水，二甲苯透明，封片。以PBS代替杂交液为阴性对照。

1.3 结果判定

DAB试剂盒进行最终的反应后，镜下观察，以细胞胞质有棕色颗粒出现为阳性表达，胞质无着色为阴性表达。以PBS代替探针的切片作为阴性对照。

1.4 统计学处理

组间比较计量资料采用t检验，计数资料采用 χ^2 检验或Fisher's exact test。

2 结果

hMSH2基因mRNA阳性表达细胞主要是食管癌、癌旁及正常粘膜腺体的腺细胞，偶尔在细胞间质中有散在阳性表达，阳性表达均在细胞胞质，而在肌组织中未见有阳性表达。不同组织间hMSH2基因mRNA的阳性表达率见表1。不同组织hMSH2基因mRNA的阳性表达情况见图1~3。不同食管癌组织病理学类型间hMSH2基因mRNA表达情况见表2。

表 1 不同食管癌组织中 *hMSH2* 基因 mRNA 表达Tab.1 Expression of *hMSH2* mRNA in different tissues of esophageal cancer

Histological type	n	Positive sample	Negative sample
Cancer tissues	32	15(46.88%)	17(53.12%)
Adjacent tissues	32	17(53.12%)	15(46.88%)
Normal tissues	32	27(84.38%)	5(15.62%)

$\chi^2=8.514$, $P=0.803$ between cancer tissues and adjacent tissues ;

$P=0.003$ between cancer tissues and normal tissues;

$P=0.014$ between adjacent tissues of the cancer and normal tissues.

表 2 不同食管癌组织病理学类型间 *hMSH2* 基因 mRNA 表达情况比较Tab.2 Comparison of *hMSH2* mRNA expression between esophageal cancer tissues of different pathological types

	Sample	Positive sample	Negative sample	χ^2 value	P value
Age*(years)		62.3±6.4	63.3±8.4	0.3747	0.711
Sex*					1.000
Male	19	9	10		
Female	13	6	7		
Cancer size*					0.502
<5 cm	17	9	8		
≥5 cm	15	6	9		
Tumor location				4.141	0.126
Top	4	0	4		
Middle	16	9	7		
Lower	12	6	6		
Pathological type				2.123	0.346
Squamous-cell carcinoma	25	12	13		
Adenocarcinoma	5	3	2		
Squamous-cell adenocacinoma	2	0	2		
Invasion depth*					0.220
Membrane	1	1	0		
Musculature	18	10	8		
Full thickness	13	4	9		
Lymphatic metastasis *					0.444
Present	23	12	11		
Absent	9	3	6		
Histological type *					0.712
I - II	22	11	11		
III -IV	10	4	6		

#: t test; *: Fisher's exact test

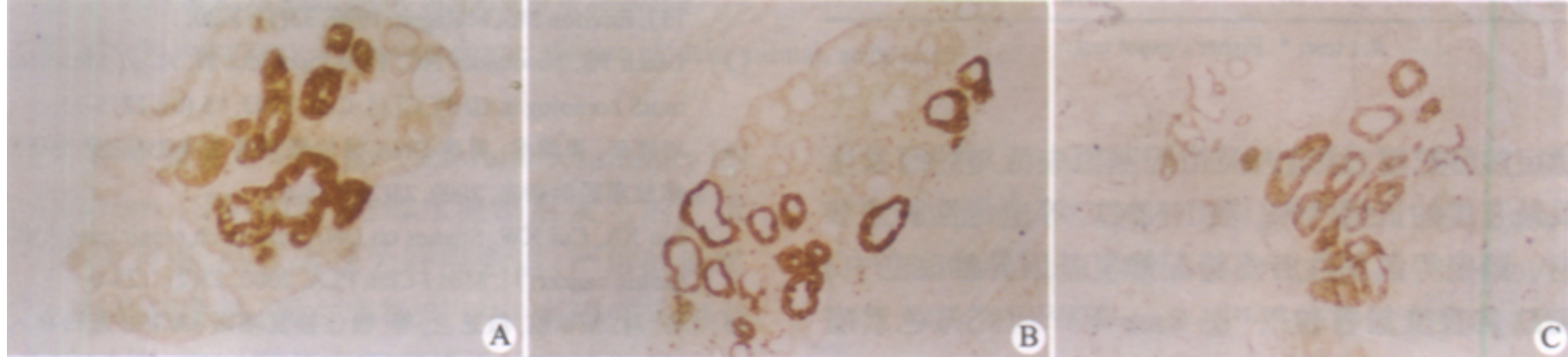


图1 不同食管癌组织中hMSH2基因mRNA表达(原位杂交, 原放大倍数: ×100)
 Fig.1 Expression of hMSH2 mRNA in different tissues of esophageal cancer
 (In situ hybridization, original magnification: ×100)
 A: Cancer tissues; B: Adjacent tissues; C: Normal tissues

3 讨论

人类错配修复基因不同于癌基因和抑癌基因, 是一类新的肿瘤相关基因, 其存在能消除DNA生物合成中的错误, 增加DNA复制的可信度, 并在防止自由突变方面起重要作用; 其缺陷可导致复制错误的大量增加, 导致肿瘤微卫星不稳定, 并使一系列重要的表达基因产生移码突变而失活, 故在肿瘤的发生发展中起重要作用, 被认为是肿瘤发生的一种可能机制[8]。人类错配修复基因最早是在细菌中被发现, 这些基因最早被命名为mut基因, 即产生突变子之意。在大肠杆菌中发现4个mut基因, 分别被命名为MutS、MutL、MutH和MutU。不久, 在酵母菌中也发现了6个同源基因, 分别被命名为MSH1~6。在人类至今已发现6个同源基因, 分别是hMSH2、hMSH3、hMSH6、hMLH1、hPMS1和hPMS2[9], 其中hMSH2是发现最早的DNA错配修复基因[3], 其在肿瘤发病中的作用也研究较多。动物实验已经发现hMSH2基因失活的小鼠, 在出生后不久几乎均发生了包含有DNA微卫星不稳定的淋巴瘤, 这是人类错配修复基因失活与肿瘤发生相关最直接的证据[10][11][12]。在HNPCC等遗传性肿瘤和胃癌、肺癌等散发性肿瘤错配修复基因异常改变中, hMSH2的突变居首位[13][14]。Rass等[15]研究黑色素瘤中mRNA的表达情况, 认为hMSH2在恶性黑色素瘤的基因稳定、肿瘤起源和侵袭性方面有重要作用。李华川等[16]采用RT-PCR方法研究发现hMSH2基因在食管癌组织中的表达明显降低, 占22.6%。作者应用原位杂交方法研究发现食管癌组织hMSH2在癌组织和癌旁组织中阳性表达率分别为46.9%和53.3%, 正常食管组织中阳性率为86.7%, 食管癌与癌旁组织中比较, 阳性率差异无统计学意义($P>0.05$), 而两者与正常食管组织hMSH2阳性率比较差异均有统计学意义($P<0.05$)。进一步与临床病理资料联系研究发现, hMSH2阳性表达率与年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤位置、病理类型、组织学分级、淋巴结转移、浸润深度等均无明显相关性($P>0.05$), 提示hMSH2的缺失是食管癌发生的早期事件。

hMSH2阳性表达细胞主要是食管粘膜腺体的腺细胞, 在细胞间质中有散在阳性表达, 阳性表达均在细胞胞质, 而在肌组织中未见有阳性表达。从图1~3可以看出, 正常食管组织阳性表达时腺体细胞几乎全部表达, 而食管癌及癌旁组织阳性表达时仅部分腺体细胞阳性表达, 说明其阳性强度也弱于正常组织, 这与张钦宪等[17]所报道的在正常胃粘膜组织中的表达强度高于胃癌和癌旁组织有相似之处。hMSH2可能通过下列途径参与肿瘤的发生和发展[18]: (1) 增加癌基因和/或抑癌基因突变率; (2) 使一些重要的功能基因发生遗传不稳定; (3) 通过化学物质使细胞损伤。由此可见, 对hMSH2基因的研究和检测有助于了解肿瘤的发生发展机制, 但是仍有许多问题有待解决。hMSH2如何引起肿瘤及在哪些水平起作用? hMSH2的突变在引起肿瘤及其发生发展中起多大作用? 有些学者选择免疫组化检测错配修复蛋白的表达情况, 有些学者选择多普勒PCR或/和原位杂交检测错配修复基因mRNA的表达等, 也有学者采用测序法研究, 究竟哪种方法更加有效且简便还有待进一步探讨。hMSH2与其他几种错配修复基因如何互相作用也有待进一步明确。

参考文献:

- [1] Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, et al. Human DNA repair gene[J]. Science, 2001, 29(5507): 1284-94.
- [2] Yu Z, Chen J, Ford BN, et al. Human DNA repair systems: a review[J]. Environ Mol Mutagen, 1999, 33(1): 3-20.
- [3] Leach FS, Nicolaidis NC, Papadopoulos N, et al. Mutations of a mutS homolog in HNPCC[J]. Cell, 1993, 75(6): 1215-25.
- [4] 刘晓茹, 崔娴维. 胃癌DNA错配修复基因hMSH2突变研究[J]. 解放军医学杂志, 2000, 25(2): 125-6.
- [5] Liu XR, Cui XW. Studies on DNA mismatch repair gene hMSH2 in gastric cancer[J]. Med J Chin PLA, 2000, 25(2): 125-6.
- [6] 马琳, 张军航, 鼓芝兰, 等. 错配修复基因hMSH2蛋白在人卵巢恶性肿瘤组织中的表达及其临床意义[J]. 中华妇产科杂志, 2000, 35(5): 291-3.
- [7] Ma L, Zhang JH, Gu LZ, et al. Expression of mismatch repair gene hMSH2 in human malignant ovarian tumors and its clinical significance[J]. Chin J Obstet Gynecol, 2000, 35(5): 291-3.
- [8] 王立东, 郑树. 河南食管癌高发区人群食管和贲门癌变机制[J]. 郑州大学学报(医学版), 2002, 37(6): 717-29.

- Wang LD, Zheng S. Cancerizational mechanism of esophageal and cardia carcinoma in the high-occurrence region[J]. J Zhengzhou Univ (Med Sci), 2002, 37(6): 717-29.
- [7] 王立东, 高文俊, 杨万才, 等. 林州市人民医院9年食管、贲门癌3933例分析[J]. 河南医科大学学报, 1997, 32(1): 9-12.
- Wang LD, Gao WJ, Yang WC, et al. Analysis of 3933 case esophageal or cardia carcinoma in nine years of Linzhou People's Hospital[J]. J Henan Med Coll, 1997, 32(1): 9-12.
- [8] 沈肖曹, 史时芳, 谢立平. 人类错配修复基因系统与肿瘤[J]. 国外医学·泌尿系统分册 (Foreign Med Sci·Urol Nephrol Sect), 2001, 21(Suppl): 10-2.
- [9] Fink D, Aebi S, Howell SB, et al. The role of DNA mismatch repair in drug resistance[J]. Clin Cancer Res, 1998, 4(1): 1-6.
- [10] Ouyang H, Shiwaku Y, Hagiwara H, et al. The insulin-like growth factor receptor gene os mutated in genetically unstable cancers of the endometrium stomach and colorectum [J]. Cancer Res, 1997, 57(10): 1851-4.
- [11] 黄少明, 郑镇木, 吴晓翔, 等. 胸段食管癌外科治疗326例报告[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(10): 949-50.
- Huang SM, Zheng ZM, Wu XX, et al. Surgical treatment of thoracic esophageal carcinoma: report of 326 cases [J]. J First Mil Med U-niv/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(10): 949-50.
- [12] 宋维舒. 放疗后化疗治疗食管癌96例疗效观察[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(9): 703-5.
- Song WS. Analysis of 96 case esophageal cancer with chemical therapy after radiative therapy[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2001, 21(9): 703-5.
- [13] Maruyama A, Saito T, Hachitanda Y, et al. Cancer history and loss of MSH2 and MLH1 protein expression in patients with endometrial hyperplasia[J]. Int J Gynecol Cancer, 2003, 13(3): 352-60.
- [14] Wang Y, Friedl W, Lamberti C, et al. Hereditary nonpolyposis col-orectal cancer: frequent occurrence of large genomic deletions in MSH2 and MLH1 genes[J]. Int J Cancer, 2003, 103(5): 636-41.
- [15] Rass K, Gutwein P, Welter C, et al. DNA mismatch repair enzyme hMSH2 in malignant melanoma: increased immunoreactivity as compared to acquired melanocytic nevi and strong mRNA expres-sion in melanoma cell lines[J]. Histochem J, 2001, 33(8): 459-67.
- [16] 李华川, 赵新吉, 刘海玲, 等. 食管癌和贲门癌组织中错配修复基因表达的研究[J]. 肿瘤杂志, 2002, 22(1): 23-5.
- Li HC, Zhao XJ, Liu HL, et al. Studies of expression of mismatch repair gene in esophageal and cardia carcinoma tissues[J]. J Cancer, 2002, 22(1): 23-5.
- [17] 张钦宪, 杜 鹏, 乐晓平, 等. 胃癌组织错配修复基因hMSH2 mRNA的表达[J]. 河南医科大学学报, 2001, 36(4): 379-82.
- Zhang QX, Du P, Le XP, et al. Expression of mismatch repair gene hMSH2 mRNA in gastric cancer tissues[J]. J Henan Med Coll, 2001, 36(4): 379-82.
- [18] 李佩玲, 刘梅梅, 倪 江. 错配修复基因hMSH2研究的新进展[J]. 国外医学·遗传学分册 (Foreign Med Sci·Genet Sect), 2002, 25(4): 224-7.

参考文献:

- [1] Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, et al. Human DNA repair gene[J]. Science, 2001, 29(5507): 1284-94.
- [2] Yu Z, Chen J, Ford BN, et al. Human DNA repair systems: a review[J]. Environ Mol Mutagen, 1999, 33(1): 3-20.
- [3] Leach FS, Nicolaidides NC, Papadopoulous N, et al. Mutations of a mutS homolog in HNPCC[J]. Cell, 1993, 75(6): 1215-25.
- [4] 刘晓茹, 崔娴维. 胃癌DNA错位修复基因hMSH2突变研究[J]. 解放军医学杂志, 2000, 25(2): 125-6.
- Liu XR, Cui XW. Studies on DNA mismatch repair gene hMSH2 in gastric cancer[J]. Med J Chin PLA, 2000, 25(2): 125-6.
- [5] 马 琳, 张军航, 鼓芝兰, 等. 错位修复基因hMSH2蛋白在人卵巢恶性肿瘤组织中的表达及其临床意义[J]. 中华妇产科杂志, 2000, 35(5): 291-3.
- Ma L, Zhang JH, Gu LZ, et al. Expression of mismatch repair gene hMSH2 in human maligant ovarian tumors and its clinical signifi-cance[J]. Chin J Obstet Gynecol, 2000, 35(5): 291-3.
- [6] 王立东, 郑 树. 河南食管癌高发区人群食管和贲门癌变机制[J]. 郑州大学学报(医学版), 2002, 37(6): 717-29.
- Wang LD, Zheng S. Cancerizational mechanism of esophageal and cardia carcinoma in the high-occurrence region[J]. J Zhengzhou Univ (Med Sci), 2002, 37(6): 717-29.
- [7] 王立东, 高文俊, 杨万才, 等. 林州市人民医院9年食管、贲门癌3933例分析[J]. 河南医科大学学报, 1997, 32(1): 9-12.
- Wang LD, Gao WJ, Yang WC, et al. Analysis of 3933 case esophageal or cardia carcinoma in nine years of Linzhou People's Hospital[J]. J Henan Med Coll, 1997, 32(1): 9-12.

- [8] 沈肖曹, 史时芳, 谢立平. 人类错配修复基因系统与肿瘤[J]. 国外医学·泌尿系统分册 (Foreign Med Sci·Urol Nephrol Sect), 2001, 21(Suppl): 10-2.
- [9] Fink D, Aebi S, Howell SB, et al. The role of DNA mismatch repair in drug resistance[J]. Clin Cancer Res, 1998, 4(1): 1-6.
- [10] Ouyang H, Shiwaku Y, Hagiwara H, et al. The insulin-like growth factor receptor gene is mutated in genetically unstable cancers of the endometrium stomach and colorectum [J]. Cancer Res, 1997, 57(10): 1851-4.
- [11] 黄少明, 郑镇木, 吴晓翔, 等. 胸段食管癌外科治疗326例报告[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(10): 949-50.
- Huang SM, Zheng ZM, Wu XX, et al. Surgical treatment of thoracic esophageal carcinoma: report of 326 cases [J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(10): 949-50.
- [12] 宋维舒. 放疗后化疗治疗食管癌96例疗效观察[J]. 第一军医大学学报, 2001, 21(9): 703-5.
- Song WS. Analysis of 96 case esophageal cancer with chemical therapy after radiative therapy[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2001, 21(9): 703-5.
- [13] Maruyama A, Saito T, Hachitanda Y, et al. Cancer history and loss of MSH2 and MLH1 protein expression in patients with endometrial hyperplasia[J]. Int J Gynecol Cancer, 2003, 13(3): 352-60.
- [14] Wang Y, Friedl W, Lamberti C, et al. Hereditary nonpolyposis col-orectal cancer: frequent occurrence of large genomic deletions in MSH2 and MLH1 genes[J]. Int J Cancer, 2003, 103(5): 636-41.
- [15] Rass K, Gutwein P, Welter C, et al. DNA mismatch repair enzyme hMSH2 in malignant melanoma: increased immunoreactivity as compared to acquired melanocytic nevi and strong mRNA expression in melanoma cell lines[J]. Histochem J, 2001, 33(8): 459-67.
- [16] 李华川, 赵新吉, 刘海玲, 等. 食管癌和贲门癌组织中错配修复基因表达的研究[J]. 肿瘤杂志, 2002, 22(1): 23-5.
- Li HC, Zhao XJ, Liu HL, et al. Studies of expression of mismatch repair gene in esophageal and cardia carcinoma tissues[J]. J Cancer, 2002, 22(1): 23-5.
- [17] 张钦宪, 杜鹏, 乐晓平, 等. 胃癌组织错配修复基因hMSH2 mRNA的表达[J]. 河南医科大学学报, 2001, 36(4): 379-82.
- Zhang QX, Du P, Le XP, et al. Expression of mismatch repair gene hMSH2 mRNA in gastric cancer tissues[J]. J Henan Med Coll, 2001, 36(4): 379-82.
- [18] 李佩玲, 刘梅梅, 倪江. 错配修复基因hMSH2研究的新进展[J]. 国外医学·遗传学分册 (Foreign Med Sci·Genet Sect), 2002, 25(4): 224-7.

[回结果列表](#)