

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)11-1027-03

## 食管癌组织 hMSH2 mRNA 的表达和启动子区甲基化

张功员, 刘秋亮, 乐晓萍, 丁一, 张钦宪 (郑州大学基础医学院组织学与胚胎学教研室, 河南 郑州 450001)

## Expression and promoter methylation of hMSH2 gene in esophageal cancer tissue

ZHANG Gong-Yuan, LIU Qiu-Liang, LE Xiao-Ping, DING Yi, ZHANG Qin-Xian

Department of Histology and Embryology, College of Basic Medicine, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

**【Abstract】** AIM: To detect hMSH2 gene expression and test abnormal methylation of hMSH2 gene promoter in esophageal cancer tissue. METHODS: *In situ* hybridization (ISH) and methylation-specific PCR (MSP) methods were respectively used to detect hMSH2 gene expression and hMSH2 promoter methylation in 32 cases of esophageal cancer and the corresponding normal tissues. RESULTS: The positive rate of hMSH2 was 46.9% in esophageal cancer tissues, which was significantly lower than that in the normal tissues (84.4%,  $P < 0.05$ ). The positive rate of hMSH2 gene in esophageal cancer tissues had a weak correlation with age, sex, tumor size and location, pathological type, histological grade, lymph node metastasis (Spread), and tumor infiltration depth ( $P > 0.05$ ). The occurrence rate of hMSH2 promoter methylation was 34.4% in esophageal cancer tissues, no methylation was found in normal esophageal tissues, and there was a significant difference in the incidence of promoter methylation between the 2 groups ( $P < 0.01$ ). The positive rate of promoter methylation in elder patients (age  $\geq 70$  years, 85.7%) was much higher than that in younger patients (age  $< 70$  years, 20.0%,  $P < 0.05$ ); hMSH2 promoter methylation rate (70.0%) in the patients with tissue pathological level of III-IV was much higher than that in the patients with level of I-II (18.2%,  $P < 0.05$ ). The positive rate of promoter methylation in esophageal cancer tissues with positive expression of hMSH2 gene (13.3%) was significantly lower than that in esophageal cancer tissues with negative expression (53.0%,  $P < 0.05$ ). CONCLUSION: hMSH2 gene inactivation appears at the early stage of esophageal cancer. hMSH2 gene promoter methylation is related to patient's

age and tumor pathological type, and hMSH2 gene inactivation is related to the methylation of promoter.

**【Keywords】** esophageal neoplasm; hMSH2 mRNA; methylation

**【摘要】**目的:检测食管癌组织中 hMSH2 mRNA 的表达和启动子区甲基化异常。方法:食管癌标本及相应正常食管黏膜组织 32 例。原位杂交法检测 hMSH2 mRNA 的表达,甲基化特异 PCR (MSP)法检测错配修复基因 hMSH2 启动子区甲基化。结果:食管癌组织中 hMSH2 mRNA 阳性表达率为 46.9%, 正常组织为 84.4% ( $P < 0.05$ )。hMSH2 mRNA 阳性表达率与食管癌患者年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤位置、病理类型、组织学分级、淋巴结转移、浸润深度等均无关 ( $P > 0.05$ )。食管癌组织中 hMSH2 启动子区甲基化发生率为 34.4%, 正常食管黏膜组织未发现甲基化。2 组甲基化阳性率相比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。高龄患者 ( $\geq 70$  岁)癌组织中 hMSH2 启动子区甲基化发生率 (85.7%) 明显高于较低龄患者 ( $< 70$  岁) (20.0%) ( $P < 0.05$ )。病理组织学 III、IV 级食管癌组织中 hMSH2 启动子区甲基化发生率 (70.0%) 高于 I、II 级 (18.2%) ( $P < 0.05$ )。食管癌组织中 hMSH2 mRNA 阳性组启动子区甲基化的发生率 (13.3%) 低于 hMSH2 mRNA 表达阴性组 (53.0%) ( $P < 0.05$ )。结论:hMSH2 的表达缺失是食管癌发生的早期事件,食管癌组织中 hMSH2 基因启动子区甲基化与患者年龄和肿瘤病理类型可能有关,hMSH2 基因的失活与其甲基化有一定关系。

**【关键词】**食管肿瘤; hMSH2 基因; mRNA; 甲基化**【中图分类号】**R735.1 **【文献标识码】**A

## 0 引言

中国是世界上食管癌发病率和死亡率最高的国家,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<sup>[1]</sup>。我们应用原位杂交方法检测了食管癌和正常食管组织中错配修复基因 hMSH2 mRNA 的表达,并结合患者的临床病理资料进行分析;应用甲基化特异 PCR (MSP)方法检测食管癌组织中 hMSH2 基因启动子区的甲基化状态,探讨了其与食管癌发生、发展的关系。

## 1 对象和方法

**1.1 对象** 食管癌患者 32 (男 19,女 13)例,年龄 50~78 (62.8  $\pm$  7.4)岁。术前均未接受放疗。取其手术切除癌标本及相应正常食管黏膜组织,全部手术

收稿日期 2006-12-22; 接受日期 2007-01-12

基金项目 河南省科技攻关基金(324410033)

通讯作者 张钦宪。Tel (0371) 67781953 Email zqx53@zzu.edu.cn

作者简介 张功员, 博士生(导师张钦宪)教授。Tel (0371) 67781728

Email zg@zzu.edu.cn

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,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;食管上段癌 4 例,中段癌 16 例,下段癌 12 例;肿瘤最大直径 <5 cm 17 例, ≥5 cm 15 例;浸润至黏膜 1 例,浸润至肌层 18 例,浸润至全层 13 例。32 例标本均于切除后 0.5 h 内,在癌灶及正常残端取约 1 cm × 1 cm × 1 cm 大小的组织块 2 份,一份 40 g/L 多聚甲醛固定,石蜡包埋;另一份提取 DNA。

**1.2 方法** 原位杂交试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。所有操作均按说明书进行<sup>[21]</sup>。标本采用蛋白酶 K 消化,酚/氯仿/异戊醇抽提,乙醇沉淀的经典方法提取 DNA。应用 CpGenome DNA Modification Kit (Intergen) 试剂盒修饰 DNA。PCR 扩增参照文献<sup>[3]</sup>设计针对 hMSH2 启动子去甲基化和甲基化的特异性引物。hMSH2 去甲基化引物序列为 5'-GGTT-GTTGTGGTTGGATGTTGTTT-3'(正义),5'-CAACTA-CAACATCTCCTTCAACTACACCA-3'(反义),产物长度 151 bp;甲基化引物序列为:5'-TCGTGCTCG-GACGTCGTTTC-3'(正义),5'-CAACGTCTCCTTCGAC-TACACCG-3'(反义),产物长度 150 bp。反应总体积 50 μL,反应体系为 10 × PCR buffer (Mg<sup>2+</sup> plus) (Takara) 5 μL, 2.5 mmol/L dNTP (TaKaRa) 4 μL, 20 μmol/L 引物 (Sangon) 各 1 μL, 修饰后 DNA 模板 2 μL, 83.35 mkat/L Taq DNA 聚合酶 (Takara) 0.5 μL, 循环参数 95℃ 变性 5 min, 95℃ 50 s, 58℃ (去甲基化)/56℃ (甲基化) 50 s, 72℃ 50 s, 循环 36 次,最后 72℃ 延伸 5 min。原位杂交染色后 DAB 试剂盒进行最终的反应,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。PCR 产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,溴乙锭紫外灯下观察结果并记录。

统计学处理:组间比较计量资料采用 *t* 检验,计数资料采用  $\chi^2$  检验或 Fisher's 精确概率计算,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 食管癌组织中 hMSH2 mRNA 的表达** 阳性表达细胞主要是黏膜腺体的腺细胞,在细胞间质中有散在阳性细胞,阳性表达均在细胞胞质。食管癌和正常食管黏膜组织中 hMSH2 mRNA 的阳性表达率分别是 46.9% 84.4% ( $\chi^2 = 8.514$ ,  $P = 0.014$ )。hMSH2 mRNA 阳性表达率与食管癌患者年龄、性别、肿瘤大小、肿瘤位置、病理类型、组织学分级、淋巴结转移、浸润深度等均无关 ( $P > 0.05$ )。

## 2.2 食管癌组织中 hMSH2 启动子区甲基化状态

32 例癌组织中发现甲基化 11 例,占 34.4%,未发现去甲基化;正常黏膜组织中发现去甲基化 25 例,未发现甲基化 ( $\chi^2 = 12.947$ ,  $P = 0.0003$ )。食管癌组织中的 hMSH2 启动子区甲基化与患者性别、肿瘤大小、组织学类型、浸润深度和淋巴结转移均无关 ( $P > 0.05$ ) 而与患者年龄、组织学分级有关 ( $P < 0.05$ , 表 1)。食管癌组织中 hMSH2 mRNA 阳性组中甲基化的发生率 (13.3%) 明显低于 hMSH2 mRNA 表达阴性组中的甲基化发生率 (53.0%),其差别具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

表 1 食管癌组织中 hMSH2 基因启动子区甲基化与临床病理参数的关系 [n (%)]

项目	n	甲基化阳性	P
年龄 (岁)	<70	5 (20.0)	0.003
	≥70	6 (85.7)	
性别	男	7 (36.8)	1.000
	女	4 (30.8)	
肿瘤大小 (cm)	<5.0	5 (29.4)	0.712
	≥5.0	6 (40.0)	
肿瘤位置	上/中段	7 (35.0)	1.000
	下段	4 (33.3)	
病理类型	鳞癌	8 (32.0)	0.668
	腺/腺鳞癌	3 (42.9)	
浸润深度	黏膜/肌层	6 (31.6)	0.721
	全层	5 (38.5)	
组织学分级	I, II	4 (18.2)	0.013
	III, IV	7 (70.0)	
淋巴结转移	有	9 (39.1)	0.441
	无	2 (22.2)	

## 3 讨论

人类错配修复基因能消除 DNA 生物合成中的错误,增加 DNA 复制的可信度,在防止自由突变方面起重要作用。李华川等<sup>[4]</sup>发现 hMSH2 基因在食管癌组织中的表达明显降低。我们应用原位杂交方法研究发现食管癌和正常食管黏膜组织中 hMSH2 mRNA 的阳性率分别为 46.9% 和 84.4%,二者比较差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。进一步与临床病理资料联系研究发现, hMSH2 mRNA 阳性表达率与患者年龄、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 的缺失是食管癌的发生的早期事件。阳性表达细胞主要是食管黏膜腺体的腺细胞,在细胞间质

中有散在阳性表达,阳性表达部位均在胞质。正常食管黏膜组织阳性表达时腺体细胞几乎全部表达,而食管癌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<sup>[5]</sup>所报道的在正常胃黏膜组织中的表达强度高于胃癌组织有相似之处。

我们应用 MSP 法检测食管癌组织中 hMSH2 基因启动子区甲基化状态,发现其阳性率为 34.4%,正常黏膜未发现甲基化。食管癌组织中 hMSH2 mRNA 阳性组中甲基化的发生率明显低于 hMSH2 mRNA 表达阴性组 ( $P < 0.05$ ),提示 hMSH2 启动子区甲基化与食管癌组织中 hMSH2 mRNA 的低表达有一定的关系,错配修复基因 hMSH2 mRNA 的异常变化与 hMSH2 基因启动子区甲基化有高度的相关性。本研究食管癌组织中 hMSH2 mRNA 的阴性率为 53.1%,食管癌组织中 hMSH2 基因启动子区甲基化的发生率为 34.4%,这两个率的差异提示启动子区甲基化的异常是导致 mRNA 转录受阻的原因之一,另外还有原因导致 mRNA 的转录受阻。然而 hMSH2 基因 mRNA 失表达的机制还有哪些,以及 hMSH2 基因启动子区异常甲基化导致 hMSH2 基因 mRNA 转录障碍的更具具体机制需进一步研究。hMSH2 启动子区甲基化与肿瘤的大小、部位、浸润深度及患者性别无关 ( $P >$

0.05) 而与患者年龄及肿瘤组织学分级有关 ( $P < 0.05$ ) 其中高龄患者 ( $\geq 70$  岁) 癌组织中 hMSH2 启动子区甲基化发生率 (85.7%) 明显高于较低龄 ( $< 70$  岁) 患者 (20.0%); III, IV 级 hMSH2 启动子区甲基化发生率 (70.0%) 高于 I, II 级 (18.2%), 这提示 hMSH2 基因启动子区甲基化可能参与了食管癌的发展过程,尤其在老年食管癌的发生发展中起一定作用。由于目前分析的食管癌病例较少,还有必要增大研究样本量,进一步研究食管癌组织中 hMSH2 基因的表达情况及其与 CpG 岛甲基化的相关性。

## 【参考文献】

- [1] 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): 717-729.
- [2] 张功员, 刘秋亮, 马春晓, 等. 食管癌组织中 hMSH2 基因的表达 [J]. 第一军医大学学报 2004 26(6): 662-664.
- [3] Herman JG, Umar A, Polyak K, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(12): 6870-6875.
- [4] 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): 23-25.
- [5] 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): 379-382.

编辑 袁天峰

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2007)11-1029-01

## 前臂多节段复杂离断再植成活 1 例

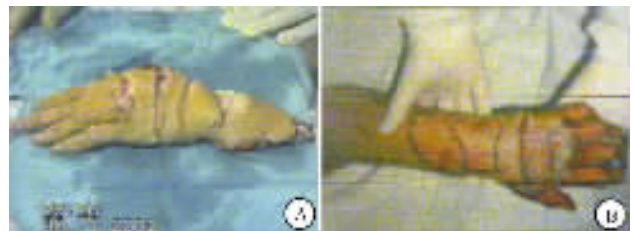
陈向阳, 朱莹, 杨爱华, 彭国华, 丁晓勇, 段炜  
(武警陕西总队医院骨科, 陕西西安 710054)

【关键词】前臂, 复杂离断, 多节段, 再植成活

【中图分类号】R658.1 【文献标识码】B

1 病例报告 女, 36 岁, 2002-01-30 因不慎被压棉机将左前臂扎断(5 刀 6 段)后 6 h 送我院骨科。查体: 左前臂从腕上 8 cm 完全离断, 腕一处及掌背部成“v”型离断, 平腕关节手背从虎口斜向第 5 掌骨基底, 手背中部横断, 平掌指关节从第 2~4 关节处“v”型离断(图 1A)。X 线片(左右对照): 左尺桡骨与腕关节上 6 cm 以远缺失, 大多角骨、月骨、第 1~5 掌骨、示指近节骨折。诊断为左前臂绞扎伤完全离断。在臂丛麻醉下行左前臂再植术, 术中分离出尺动脉、桡动脉、头静脉、贵要静脉及表浅静脉; 正中神经、尺神经、桡神经、屈腕屈指肌腱、拇长

屈肌腱、伸腕和伸指肌腱远近端。与掌部分断处分离出掌深弓及指总动脉, 指背静脉, 指总静脉, 指屈伸肌腱。分别用钢板和克氏针固定骨折及腕功能位。分段缝合动静脉共 22 处, 并于右前臂取 3 根静脉移植。缝合神经和指深屈肌腱及指伸肌腱(图 1B), 放置引流条。创口一期愈合。术后运动感觉恢复尚满意。



A: 术前; B: 术后。

图 1 左前臂扎断

2 讨论 机器致多节段离断实属罕见, 系复杂严重的离断伤, 再植条件差, 操作困难。术中对失活组织及污染组织在显微镜下彻底清创, 肝素盐水冲洗血管, 直至回流液通畅, 同时, 严密观察患者生命体征。术后严密观察患肢血运, 以防发生血管危象并在不影响肢体成活和骨折愈合情况下早期适量锻炼, 以利恢复。

编辑 黄良田

收稿日期 2007-04-29; 接受日期 2007-05-18

作者简介 陈向阳, 学士, 医师。Tel: (029) 82246044 Email: wunaxjtu

@sohu.com