

# MMR 蛋白在云南地区遗传性非息肉病性大肠癌中的表达及意义

彭 勇<sup>1</sup>, 武治国<sup>1</sup>, 毛剑峰<sup>1</sup>, 陈明清<sup>2</sup>, 董 坚<sup>1</sup>

## Expression of MMR Proteins in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer in Yunnan Region

PENG Yong<sup>1</sup>, WU Zhi-guo<sup>1</sup>, MAO Jian-feng<sup>1</sup>, CHEN Ming-qing<sup>2</sup>, DONG Jian<sup>1</sup>

1. Department of Biotherapy Center, The 1st Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650031, China, 2. Department of Cancer Center

Corresponding Author: CHEN Ming-qing, E-mail: mingqingchen@ydy. cn; DONG Jian, E-mail: dongjian@yahoo. com

**Abstract: Objective** To evaluate the significance of the expression of MLH1, MSH2, PMS2 and MSH6 proteins in hereditary non polyposis colorectal cancer cases in Yunnan region. **Methods** Using current three criteria commonly used in China and abroad to select HNPCC 19 tumor tissue cases from 13 families in Yunnan region, and these tumor tissue were assessed by immunohistochemical detection of MLH1, MSH2, PMS2 and MSH6 proteins. **Results** In the 19 tumor tissues cases, the expression loss rates of MLH1, MSH2, PMS2 and MSH6 proteins were 30. 77%, 38. 46%, 23. 08% and 15. 38% respectively. And in these case of absent of MMR protein, 2 cases were lost MLH1 and PMS2 proteins at the same time; 3 cases lost MSH2 and MSH6 at the same time. The total expression loss rates of four MMR proteins was 84. 62%. **Conclusion** The suspected HNPCC cases in the Yunnan region had loss of expression of the MMR(MLH1, MSH2, PMS2, MSH6). The immunohistochemical detection of MMR proteins can be used as an effective technique in screening HNPCC pedigrees.

**Key words:** Colorectal neoplasms; Hereditary nonpolyposis; Mismatch repair protein; Immunohistochemistry

**摘要:目的** 探讨 MLH1、MSH2、PMS2 和 MSH6 蛋白在云南地区遗传性非息肉病性大肠癌(hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC)中的表达及意义。**方法** 根据目前国内外通常采用的三个标准在云南地区选择遗传性非息肉病性大肠癌病例 13 个家系中 19 例肿瘤组织,应用免疫组织化学方法(IHC)检测 MLH1、MSH2、PMS2 和 MSH6 蛋白。**结果** 在这 13 个家系中,MLH1、MSH2、PMS2 和 MSH6 四种蛋白表达缺失率分别为 30. 77%、38. 46%、23. 08%、15. 38%,其中 2 例家系先证者同时存在 MLH1 和 PMS2 蛋白表达缺失,2 例家系先证者同时存在 MSH2 和 MSH6 蛋白表达缺失,四种 MMR 蛋白总的表达缺失率为 84. 62%。**结论** 云南地区 HNPCC 病例存在 MLH1、MSH2、PMS2 和 MSH6 四种 MMR 蛋白不同程度的缺失表达,应用 IHC 检测 MMR 蛋白可以作为筛选 HNPCC 家系的一有效手段。

**关键词:** 结直肠肿瘤; 遗传性非息肉病性; 错配修复蛋白; 免疫组织化学

**中图分类号:** R735. 3<sup>+</sup> 4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2011)03-0270-04

## 0 引言

遗传性非息肉病性大肠癌(hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC)又称 Lynch 综合

征,是一种由错配修复基因(mismatch repair gene, MMR)突变引起的常染色体显性遗传病,以青少年(≤40 岁)多见<sup>[1]</sup>。MMR 的产物是错配修复蛋白,为一种核酸水解酶,通过在 DNA 复制过程中修复错配的碱基使 DNA 能精确复制,保证人类遗传的保守性和稳定性。当 MMR 发生突变,错配修复蛋白的表达量下降、不表达或出现截短,对 DNA 复制过程中发生的缺失和插入不能校正或纠错,引起基因组 DNA 不稳定。研究显示与 HNPCC 相关的 MMR 主要是 MLH1、MSH2、PMS2 和 MSH6,现

收稿日期:2010-01-06;修回日期:2010-06-03

基金项目:云南省社会发展科技计划基金资助项目(2007CA009)

作者单位:1. 650031 昆明,昆明医学院第一附属医院生物治疗科,2. 肿瘤治疗中心

通信作者:陈明清, E-mail: mingqingchen@ydy. cn; 董坚, E-mail: dongjian@yahoo. com

作者简介:彭勇(1976-),男,硕士在读,主治医师,主要从事胃肠肿瘤临床与基础研究

有研究多数集中在 MLH1 和 MSH2 这两种基因,为此,本研究探讨联合四种 MMR 蛋白的抗体全面检测云南地区 HNPCC 家系的 MMR 蛋白缺失表达情况,进一步分析联合应用四种抗体的免疫组织化学方法在筛选 HNPCC 病例中的作用。

## 1 资料和方法

### 1.1 资料来源

13 个 HNPCC 家系中先证者组织蜡块来自于云南省不同地区,其中 4 个家系符合 Amsterdam 标准 I、II,这 4 个家系中的 2 个家系分别有 2 例不同肿瘤组织;1 个家系符合 Bethesda 指导纲要(1996 年);8 个家系符合中国人 HNPCC 家系筛检标准(2003 年),这 8 个家系中的 2 个家系中分别有 3 例不同肿瘤组织,其中一个家系中 2 例为大肠癌组织,1 例为子宫内膜癌组织,另一个家系中 2 例为大肠癌组织,1 例为胃癌组织。MLH1、MSH2、PMS2 和 MSH6 抗体(SANTA CRUZ 公司);免疫组织化学试剂盒(福州迈新生物技术公司)。

### 1.2 方法

石蜡切片脱蜡至水,PBS 液冲洗。用 pH 值为 6.0 的柠檬酸盐缓冲液对组织抗原进行修复。3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温下培养 10 min,PBS 液冲洗。滴加正常山羊血清工作液,室温培养 20 min,倾去液体。滴加稀释好的一抗(1:50)50 μl,4℃ 培养过夜,PBS 缓冲液冲洗。滴加生物素化二抗工作液,37℃ 培养 15 min,PBS 冲洗。滴加辣根酶标记链酶卵白素工作液,37℃ 培养 15 min,PBS 液冲洗。DAB 显色,自来水冲洗,以苏木精对比染色细胞,中性树胶封固切片。

### 1.3 结果判定

正常肠组织 MMR 蛋白表达为阳性,当组织发生 HNPCC 时,MMR 蛋白表达则为阴性。据此,当肿瘤细胞显示核染色阳性时,则将该病例判为蛋白表达阳性,否则判为表达阴性。如果一张切片只有局部染色、细胞质染色以及同一张切片中缺乏正常的染色则判定为染色结果不确定。阳性对照为内部良性肠上皮和(或)淋巴细胞阳性核染色。

## 2 结果

### 2.1 MMR 蛋白在 HNPCC 病例中的缺失表达情况

应用 IHC 对 13 个 HNPCC 家系中 19 例肿瘤组织检测 MMR 蛋白(MLH1、MSH2、PMS2 和 MSH6)的表达,结果显示一个家系中有 2 例或以上的肿瘤组织 MMR 蛋白表达缺失情况一致。在 13 个家系先证者中四种 MMR 蛋白的缺失表达率分别为:MLH1 30.77%(4/13)、MSH2 38.46%(5/13)、PMS2 23.08%(3/13)、MSH6 15.38%(2/13)。并且有 2 例(15.38%)先证者同时存在 MLH1 和 PMS2 蛋白表达缺失,有 2 例(15.38%)先证者同时存在 MSH2 和 MSH6 蛋白表达缺失。仅用 MLH1 和 MSH2 抗体检测 HNPCC 患者的 MMR 蛋白的敏感度为 69.23%(9/13),附加 PMS2 和 MSH6 抗体的 IHC 的敏感度增至 84.62%(11/13)。

### 2.2 MMR 蛋白在 HNPCC 病例中表达的不可确定的染色结果

常见不可确定的染色结果有:(1)局部染色;(2)细胞质染色;(3)缺乏阳性内参照,整个肿瘤组织均质阴性。本实验中四种 MMR 抗体的 IHC 染色均不同程度地出现了上述 3 类不可确定的染色结果,各抗体发生不同染色结果的频率见表 1。

## 3 讨论

1996 年,针对 MMR 蛋白的单克隆抗体开始出现,第一个抗体为 MSH2,之后有了其他抗体,抗体的出现提示检测 MMR 蛋白的可能,进一步为临床提供了一个可选择的检测 MMR 蛋白缺失的方法<sup>[2]</sup>。

目前国内应用 IHC 研究 HNPCC 主要集中在 MLH1 和 MSH2,大量文献研究显示单独应用这两种抗体筛选 HNPCC 的敏感度和特异性相对较低,而 MLH1 的敏感度和特异性更低。Ramsoekh 等<sup>[3]</sup>发现 MLH1 和 MSH2 的敏感度为 77.80%,MLH1 的敏感度为 44.4%。其原因可能为超过 1/3 的 MLH1 无义突变导致突变蛋白的催化活性丧失而抗原性完整<sup>[4]</sup>。同时,有研究认为 MLH1 基因

表 1 MMR 蛋白免疫组织化学染色的不可确定染色结果的发生频率

Table 1 Frequencies of undefined IHC results for the MMR proteins

	MLH1	MSH2	PMS2	MSH6	Total
Partial staining	1/19	0/19	0/19	0/19	1/19
Cytoplasmic staining	2/19	2/19	0/19	0/19	4/19
No positive compare	0/19	0/19	0/19	1/19	1/19
Total	3/19 (15.78%)	2/19 (10.53%)	0/19 (0%)	1/19 (5.26%)	6/19 (31.58%)

启动子区 CpG 岛的过度甲基化也是导致基因失活、肿瘤发生的一种机制<sup>[5]</sup>。而且,有研究发现在无 MLH1/MSH2 异常具有不典型 HNPCC 临床表现的患者,及少部分典型 HNPCC 患者中常见 MSH6 基因的突变,这导致 MSH2 的低敏感度<sup>[6]</sup>。上述研究表明,仅用 MLH1 和 MSH2 抗体不能完全检测到 HNPCC 患者的基因突变。

早期对 MLH1 和 MSH2 基因突变的研究给人一种错误的印象,即和 MSI 比较,IHC 的敏感度更低。但是,在增加 PMS2 和 MSH6 抗体后的结果显示 IHC 的预测价值和 MSI 检测相当。近来研究显示 PMS2 基因的单等位基因突变可能在 HNPCC 的发病中占有重要作用<sup>[7]</sup>。一项研究<sup>[8]</sup>在 97 例无 MLH1、MSH2 和 MSH6 突变的大肠癌患者中检测到 4 例 PMS2 突变,其中 3 例同时存在 MLH1 和 PMS2 突变。de Jong 等<sup>[9]</sup>也在 MLH1 阳性表达病例中检测到 23% 的 PMS2 的缺失表达。多数研究表明在 HNPCC 病例中存在 MSH6 突变。结果表明云南地区 HNPCC 家系中先证者肿瘤组织存在上述四种 MMR 蛋白的缺失表达,联合应用四种 MMR 抗体的 IHC 可以作为初步筛选 HNPCC 家系的一个简单易行且经济有效的方法。最近 Shia 等<sup>[10]</sup>提议应用 PMS2 和 MSH6 两种抗体组合代替目前的四种抗体组合作为 HNPCC 的首要筛选工具,认为 PMS2 和 MSH6 抗体有能力预测这四种 MMR 基因突变。

本研究对一个家系中能收集到的多例肿瘤组织均做了 IHC 检测,结果显示先证者和家系内其他成员的 MMR 蛋白表达情况一致。为此,本研究选择家系先证者的 MMR 蛋白表达情况计算其缺失率。这也进一步解释了 HNPCC 的遗传学特点,HNPCC 是一种由 MMR 的种系突变导致的常染色体显性遗传病,其家族中有 50% 的成员可能携带该基因的突变,携带该基因突变的患者发生结直肠癌的危险性在 90% 以上<sup>[11]</sup>。在 HNPCC 家系中,如果双亲之一将致病 MMR 遗传给他们的子女,子女的半数可能发病或者为表型正常的致病 MMR 携带者。反之,如果其子女已经出现 HNPCC 的临床表现,那么他一定具有和家系中其他患者相同的基因改变,但临床表现可不相同,此即为遗传学上的表现度差异。本研究表明在研究 HNPCC 家系的遗传学特点时,可以仅针对其先证者研究,这可以为预防家系中的其他患者提供了理论依据,并可以节约研究资源,减轻患者的经济负担。

尽管上述探讨了应用 IHC 筛选 HNPCC 的优点,但是目前对 IHC 染色的判断仍存在一些我们不能解释的染色结果,比如:局部染色、细胞质染色或者是缺乏阳性内参照。产生上述染色的原因可解释为:(1)MMR 基因之间存在着相互作用,可通过 RNA 延迟或其他类似的机制使基因发生突变时蛋白仍正常表达;(2)由于肿瘤标本中检测的 MLH1 和 MSH2 基因的体细胞突变、而错配修复基因的体细胞突变在散发性结直肠癌中也可能起一定作用,因而出现假阳性结果;(3)错配修复基因家族中其他成员也可能导致 HNPCC,可能出现假阴性结果;(4)石蜡包埋组织保存时间较长,组织缺氧和氧化应激可损伤组织的 MMR 功能引起局部染色<sup>[12]</sup>。

总之,云南地区 HNPCC 病例中存在不同程度的 MLH1、MSH2、PMS2 和 MSH6 蛋白缺失表达,增加 PMS2 和 MSH6 抗体能明显提高 IHC 筛选 HNPCC 病例的敏感度,临床上可以联合应用这四种抗体来筛选 HNPCC 患者。但是,我们仍需不断摸索合适 MMR 蛋白的 IHC 染色方法,同时还需专业的病理医师对染色结果做出确切的分析。总的来说,免疫组织化学的缺点是存在的,然而大多数缺点可以通过适当的抗体组合、实验过程的优化、理论和经验的提高而改进,随着研究的深入,免疫组织化学将在 HNPCC 的基础和临床方面得到更多的应用与发展。

#### 参考文献:

- [1] Jass JR. Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer: the rise and fall of a confusing term[J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(31):4943-4950.
- [2] Leach FS, Polyak K, Burrell M, et al. Expression of the human mismatch repair gene hMSH2 in normal and neoplastic tissues[J]. *Cancer Res*, 1996, 56(2):235-240.
- [3] Ramsoekh D, Wagner A, van Leerdam ME, et al. A high incidence of MSH6 Mutations in Amsterdam criteria II-negative families tested in a diagnostic setting[J]. *Gut*, 2008, 57(11):1539-1544.
- [4] Peltomäki P, Vasen H. Mutations associated with HNPCC predisposition—update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation database[J]. *Dis Markers*, 2004, 20(4-5):269-276.
- [5] Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age[J]. *Nat Genet*, 1999, 21(2):163-167.
- [6] Wagner A, Hendriks Y, Meijers-Heijboer EJ, et al. Atypical HNPCC owing to MSH6 germline mutations: analysis of a large Dutch pedigree[J]. *J Med Genet*, 2001, 38(5):318-322.
- [7] Senter L, Clendenning M, Sotamaa K, et al. The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germ-line PMS2 mutations [J]. *Gastroenterology*, 2008, 135(2):419-428.

- [8] Niessen RC, Kleibeuker JH, Westers H, et al. PMS2 Involvement in patients suspected of Lynch syndrome [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2009, 48(4):322-329.
- [9] de Jong AE, van Puijenbroek M, Hendriks Y, et al. Microsatellite instability, immunohistochemistry, and additional PMS2 staining in suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(3):972-980.
- [10] Shia J, Vakiani E, Guillem J, et al. Immunohistochemistry (IHC) as first-line screening tool for detecting colorectal cancer (CRC) patients at risk for Lynch syndrome: a 2-antibody panel is as predictive as a 4-antibody panel (Abstr)[J]. *Mod Pathol*, 2008, 21(Suppl 1):138A.
- [11] 黑金鹰, 崔龙, 孟荣贵, 等. 遗传性非息肉病性结直肠癌家族多原发癌的特点[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2001, 4(3):165-166.
- [12] Jass JR. hMLH1 and hMSH2 immunostaining in colorectal cancer[J]. *Gut*, 2000, 47(2):315-316.
- [编辑:周永红;校对:杨 卉]

• 简讯 •

中国癌症研究英文杂志(SCI 收录)  
开通在线投审稿系统

中国癌症研究英文杂志(Chinese Journal of Cancer Research)(ISSN1000-9604, CN11-2591/R)是中国科协主管、中国抗癌协会主办、北京大学临床肿瘤学院(北京市肿瘤防治研究所暨北京肿瘤医院)承办的全英文肿瘤学期刊。本刊被国内外各主要数据库收录,是中国科技核心期刊。2008 年被 SCI 和 JCR(期刊引证报告)收录,并与世界著名出版公司 Springer 合作出版。

为方便作者投稿,并使投、审稿过程进一步规范化,本刊现已开通使用界面友好的在线投审稿系统 ScholarOne Manuscripts。

投稿请登录 <http://mc03.manuscriptcentral.com/cjcr>,或登录本刊网站 <http://www.cjrbj.com> 点击 online submission 导航栏登录到作者中心上传稿件。

《中国癌症研究英文杂志》编辑部