

# 错配修复基因 hMLH1、hMSH2 及 PCNA 在肺癌组织中的表达及意义

虞新兰,白明

Expression of Human Mismatch Repair Gene (hMLH1/hMSH2) and Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) in Lung Cancer and Its Significance

TUOXin-lan,BAI Ming

Department of Respiratory Medicine, Xiehe Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China

**Abstract: Objective** To investigate the expression of human mismatch repair gene (hMLH1/hMSH2) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in lung cancer and its significance. **Methods** Expression of hMLH1/hMSH2 and PCNA in 56 cases with lung cancer was examined by S-P immunohistochemical staining. **Results** In 56 cases with lung cancer, the positive expression rate of hMLH1 and hMSH2 was 35% and 28.6% respectively. The positive rate of hMLH1/hMSH2 expression in the patients with high and middle differential grades was significantly higher than that of the others ( $P < 0.01$ ), meanwhile, the positive rate of cases with lymph node metastasis was lower than that of the patients without lymph node metastasis ( $P < 0.05$ ). It wasn't positively correlated with pathological types. In 56 cases with lung cancer, PCNA labeling index (PCNA-LI) in the patients with high and middle differential grades was lower than that of the others ( $P < 0.01$ ), meanwhile, the PCNA-LI of patients with lymph node metastasis was significantly higher than that of patients without metastasis ( $P < 0.05$ ). PCNA-LI in hMLH1/hMSH2 positive lung cancer tissue was higher than that in hMLH1/hMSH2 negative tissue ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** The abnormal expression of hMLH1/hMSH2 and PCNA might be involved in the carcinogenesis process of lung cancer and correlated with differential grades and lymph node metastasis.

**Keywords:** Lung cancer; Mismatch repair gene; hMLH1; hMSH2; Proliferating cell nuclear antigen; PCNA; Immunohistochemistry

**摘要:**目的 探讨人类错配修复基因 hMLH1、hMSH2 及增殖细胞核抗原 PCNA 在肺癌组织中的表达及意义。方法 运用免疫组织化学 S-P 法对 56 例肺癌组织中 hMLH1、hMSH2 及 PCNA 的表达进行检测。结果 56 例肺癌组织中 hMLH1 的阳性表达率为 35%, hMSH2 阳性表达率为 28.6%, 分化程度高者阳性率显著高于分化程度低者 ( $P < 0.01$ ), 有淋巴结转移者 hMLH1 及 hMSH2 阳性率低于无淋巴结转移者 ( $P < 0.05$ ), 不同病理组织学类型之间 hMLH1 及 hMSH2 表达无显著差别 ( $P > 0.05$ ); 56 例肺癌组织中分化程度低者 PCNA 标记指数高于分化程度高者 ( $P < 0.01$ ), 有淋巴结转移者 PCNA 标记指数高于无淋巴结转移者 ( $P < 0.05$ ), hMLH1 及 hMSH2 阳性表达者的 PCNA 标记指数明显高于 hMLH1 及 hMSH2 阴性表达者 ( $P < 0.01$ ), 不同病理组织学类型之间 PCNA 标记指数无显著差别 ( $P > 0.05$ )。结论 hMLH1 及 hMSH2 基因的缺陷及 PCNA 的表达与肺癌的发生发展过程并与分化程度及有否淋巴结转移有关。

**关键词:** 肺癌; 错配修复基因; hMLH1; hMSH2; 增殖细胞核抗原; PCNA; 免疫组织化学

中图分类号: R734.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2004)07-0390-03

## 0 引言

肺癌是严重威胁着人类健康和生命的恶性肿瘤之一, 近年来, 其发病率和死亡率呈上升趋势, 因此, 研究其发病机制及估计预后具有重要意义。

本研究运用免疫组织化学技术, 检测了 56 例肺

癌组织中 hMLH1、hMSH2 及 PCNA 的表达情况, 以探讨其与肺癌的发生、发展及生物学行为的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

收集 2001 ~ 2002 年华东科技大学同济医学院附属同济医院肺癌术后标本 56 例, 所有标本均经常规切片 HE 染色后由高年资病理医师复核确诊为肺

收稿日期: 2004-02-26; 修回日期: 2004-04-19

作者单位: 430022 武汉, 华中科技大学同济医学院附属协和医院呼吸内科

癌。其中男 33 例(平均年龄 66 ±0.3 岁)、女 23 例(平均年龄 58 ±0.4 岁);组织学类型:鳞癌 22 例,腺癌 24 例,小细胞肺癌 10 例;组织分化程度<sup>[1]</sup>:未、低分化癌 33 例,中、高分化癌 13 例;无淋巴结转移 32 例,有淋巴结转移 24 例。

1.2 主要试剂及方法

hMSH2 单克隆抗体为美国 NEOMARKERS 公司产品,购自深圳晶美生物工程有限公司;hMLH1 及 PCNA 单克隆抗体及 SP 试剂盒为美国 ZYMED 公司产品,购自北京中山试剂公司。全部标本经 10% 的中性福尔马林固定后石蜡包埋,常规制片,按免疫组织化学 S-P 法进行染色,操作步骤按试剂盒说明书进行。以磷酸缓冲液代替一抗作阴性对照,切片内淋巴细胞棕黄色颗粒为阳性内对照;hMLH1 一抗稀释成 1 100,hMSH2 一抗稀释成 1 50,PCNA 一抗为即用型,抗原修复采用高压修复。

1.3 结果判定

hMLH1、hMSH2 及 PCNA 阳性细胞为细胞核有棕黄色颗粒分布(图略),hMLH1、hMSH2 表达判定标准:当全部的肿瘤细胞核均为阴性反应,而内对照的正常黏膜基底部细胞、淋巴细胞、成纤维细胞有核阳性表达,定为 hMSH2 蛋白丢失(阴性),而当一个以上的肿瘤细胞出现核阳性反应即为 hMSH2 蛋白正常表达(阳性);PCNA 表达判定标准:每张切片随机选取 5 个高倍视野,每个视野取 100 个肿瘤细胞,PCNA 标记指数(PCNA-LI) = 阳性细胞数/计数肿瘤细胞总数 ×100%。

1.4 统计学处理

hMLH1、hMSH2 结果用阳性率表示,采用<sup>2</sup>检验或 Fisher's 精确概率法统计;PCNA 标记指数以( $\bar{x} \pm s$ )表示,相互比较用 *t* 检验, $P < 0.05$  为有统计学意义。

2 结果

2.1 hMLH1 结果

肺癌组织中 hMLH1 表达阳性率为 35%,未、低分化肺癌阳性率显著低于高、中分化者阳性率( $P < 0.01$ );有淋巴结转移者阳性率低于无淋巴结转移( $P < 0.05$ );肺鳞癌、腺癌与小细胞肺癌阳性率之间无明显差别( $P > 0.05$ ),见表 1。

2.2 hMSH2 结果

肺癌组织中 hMSH2 表达阳性率为 28.6%,未、低分化肺癌阳性率显著低于高、中分化者阳性率( $P < 0.01$ );有淋巴结转移者阳性率低于无淋巴结转移( $P < 0.05$ );肺鳞癌、腺癌与小细胞肺癌阳性率之间无明显差别( $P > 0.05$ ),见表 2。

2.3 PCNA 结果

未、低分化肺癌 PCNA 标记指数明显高于高、中分化肺癌( $P < 0.01$ );有淋巴结转移者 PCNA 标记指数高于无淋巴结转移者( $P < 0.05$ );肺鳞癌、腺癌与小细胞肺癌阳性率之间无明显差别( $P > 0.05$ ),见表 3。

表 1 hMLH1 基因表达与肺癌病理参数的关系

| 病理参数   | 总例数 | 阳性例数 | 阳性率 (%) | <sup>2</sup> | P     |
|--------|-----|------|---------|--------------|-------|
| 组织分化程度 |     |      |         |              |       |
| 高、中分化癌 | 13  | 10   | 76.9    |              |       |
| 未、低分化癌 | 43  | 10   | 23.3    | 8.76         | <0.01 |
| 淋巴结转移  |     |      |         |              |       |
| 有      | 24  | 4    | 16.7    |              |       |
| 无      | 32  | 16   | 50.0    | 5.14         | <0.05 |
| 组织学类型  |     |      |         |              |       |
| 鳞状细胞癌  | 22  | 8    | 36.4    |              |       |
| 腺癌     | 24  | 9    | 37.5    |              |       |
| 小细胞癌   | 10  | 3    | 30.0    | 0.437        | >0.05 |

表 2 hMSH2 基因表达与肺癌病理参数的关系

| 病理参数   | 总例数 | 阳性例数 | 阳性率 (%) | <sup>2</sup> | P     |
|--------|-----|------|---------|--------------|-------|
| 组织分化程度 |     |      |         |              |       |
| 高、中分化癌 | 13  | 8    | 61.5    |              |       |
| 未、低分化癌 | 43  | 8    | 18.5    | 9.02         | <0.01 |
| 淋巴结转移  |     |      |         |              |       |
| 有      | 24  | 3    | 12.5    |              |       |
| 无      | 32  | 13   | 40.0    | 5.32         | <0.05 |
| 组织学类型  |     |      |         |              |       |
| 鳞状细胞癌  | 22  | 6    | 27.2    |              |       |
| 腺癌     | 24  | 8    | 33.3    |              |       |
| 小细胞癌   | 10  | 2    | 20.0    | 0.645        | >0.05 |

表 3 PCNA 表达与肺癌病理参数的关系

| 病理参数   | 总例数 | PCNA 标记指数  | <i>t</i> 值 | P     |
|--------|-----|------------|------------|-------|
| 组织分化程度 |     |            |            |       |
| 高、中分化癌 | 13  | 0.28 ±0.06 |            |       |
| 未、低分化癌 | 43  | 0.55 ±0.09 | 2.85       | <0.01 |
| 淋巴结转移  |     |            |            |       |
| 有      | 24  | 0.62 ±0.06 |            |       |
| 无      | 32  | 0.42 ±0.11 | 2.37       | <0.05 |
| 组织学类型  |     |            |            |       |
| 鳞状细胞癌  | 22  | 0.48 ±0.14 |            |       |
| 腺癌     | 24  | 0.49 ±0.14 |            |       |
| 小细胞癌   | 10  | 0.51 ±0.18 | 0.023      | >0.05 |

2.4 hMLH1、hMSH2 表达与 PCNA 表达的关系

hMLH1、hMSH2 阳性表达的 PCNA 标记指数明显低于 hMLH1、hMSH2 表达阴性者( $P < 0.01$ ),见表 4。

表 4 hMLH1、hMSH2 表达与 PCNA 表达的关系

| 项目       | 例数 | PCNA 标记指数  | t 值  | P     |
|----------|----|------------|------|-------|
| hMLH1 表达 |    |            |      |       |
| 阳性       | 20 | 0.38 ±0.11 | 3.93 | <0.01 |
| 阴性       | 36 | 0.57 ±0.13 |      |       |
| hMSH2 表达 |    |            |      |       |
| 阳性       | 16 | 0.37 ±0.12 | 3.84 | <0.01 |
| 阴性       | 40 | 0.55 ±0.11 |      |       |

### 3 讨论

DNA 错配修复系统 (DNA mismatch repair system, MMR) 是人体细胞中存在的一种能修复 DNA 碱基错配的安全保障系统。到目前为止,已从人体细胞中共分离克隆到 9 种 MMR 基因即 hMSH2、hMLH1、hMSH5、hMSH4、hMSH3、hMSH6 (GTBP)、hPMS1 和 hPMS2、hMLH3。

hMSH2<sup>[2]</sup> 是人们分离到的第一个与遗传性非息肉性结直肠癌 (HNPCC) 发病有关的错配修复基因,有 50% ~ 60% 的 HNPCC 是由 hMSH2 的突变引起的,hMSH2 定位于 2p16, 基因全长 3111bp, 含 2727bp 的开读框,编码 909 个氨基酸的蛋白质。

hMLH1<sup>[3]</sup> 是第二个克隆到的与 HNPCC 发病有关的错配修复基因,与大约 30% 的 HNPCC 发病有关,其定位于 3p21, 基因全长 2484bp, 含 2268bp 的开读框,编码 756 个氨基酸。

到目前为止,人们发现 hMLH1、hMSH2 不仅与 HNPCC 发病有关,还与其他许多肿瘤发生有关,如胃癌、膀胱癌等。XinarianosG 等<sup>[4]</sup> 利用免疫组化方法检测 147 例肺癌组织,hMSH2、hMLH1 低表达率分别为 57.8%、58.6%。我们研究发现:肺癌组织中 hMLH1、hMSH2 表达阳性率分别为 35%、28.6%,未、低分化肺癌阳性率显著低于高、中分化者阳性率;有淋巴结转移者阳性率低于无淋巴结转移;肺鳞癌、腺癌与小细胞肺癌阳性率之间无明显差别。此结果进一步说明了肺癌组织中 hMLH1、hMSH2 基因表达降低,且与淋巴结转移及组织分化程度有关,hMLH1、hMSH2 基因表达降低在组织学类型上没有区别可能前二者低分化较多有关,其有待进一步研究。

至于 hMLH1、hMSH2 基因表达降低的机制,有研究表明<sup>[5]</sup> hMLH1 基因在第 41 位密码子有一 C T 突变,使相应的氨基酸残基由丝氨酸变成苯丙氨

酸,hMLH1 基因启动子甲基化也是其原因之一。对 hMSH2 的突变分析表明<sup>[6]</sup>,该基因第 622 位密码子有一 C T 的突变 (CCA CTA),使正常的脯氨酸被亮氨酸取代。WangYC 等<sup>[7]</sup> 研究认为 hMSH2 的低表达与其启动子甲基化有关。XinarianosG 等<sup>[8]</sup> 研究报道:肺癌组织 MSH2 的表达降低与 p53 过表达相关 ( $P = 0.019$ ),认为 p53 是 MSH2 转录激活剂。本研究还发现:有淋巴结转移者 PCNA 标记指数高于无淋巴结转移者;未、低分化肺癌明显高于高、中分化肺癌;肺鳞癌、腺癌与小细胞肺癌 PCNA 标记指数之间无明显差别。hMLH1、hMSH2 基因表达阳性者 PCNA 标记指数明显低于 hMLH1、hMSH2 基因表达阴性者,此进一步说明了 hMLH1、hMSH2 基因是机体的保护基因,其表达降低促进了肿瘤的发生与发展。总之,肺癌的发生发展是多阶段多步骤的,其中错配修复基因 hMLH1、hMSH2 的功能降低是其因素之一。

### 参考文献:

- [1] 李玉林. 病理学[M]. 第 6 版. 北京:人民卫生出版社,2003. 183-185.
- [2] Liu B, Parsons RE, Hamilton SR, et al. hMSH2 mutations in hereditary non-polyposis colorectal cancer kindreds[J]. Cancer Res, 1994, 54 (17): 4590-4594.
- [3] Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, et al. Mutations in the DNA mismatch repair gene hMLH1 are associated with HNPCC[J]. Nature, 1994, 368 (6468): 258-261.
- [4] Xinarianos G, Scott FM, Lilo glou T, et al. hMLH1 and hMSH2 expression correlates with allelic imbalance on chromosome 3p in non-small cell lung carcinomas[J]. Cancer Res, 2000, 60 (15): 4216-4221.
- [5] Kuismanen SA, Holmberg MT, Salovaara R, et al. Genetic and epigenetic modification of MLH1 accounts for a major share of microsatellite unstable colorectal cancers[J]. Am J Pathol, 2000, 156 (5): 1773-1779.
- [6] Leach FS, Nicolaidis NC, Papadopoulos N, et al. Mutation of a hMSH2 gene in hereditary non-polyposis colorectal cancer[J]. Cell, 1993, 75 (6): 1215-1225.
- [7] Wang YC, Lu YP, Tsen g RC, et al. Inactivation of hMLH1 and hMSH2 by promoter methylation in primary non-small cell lung tumors and matched putative metastases[J]. J Clin Invest, 2003, 111 (6): 887-895.
- [8] Xinarianos G, Lilo glou T, Prime W, et al. p53 status correlates with the differential expression of the DNA mismatch repair protein MSH2 in non-small cell lung carcinoma[J]. Int J Cancer, 2002, 101 (3): 248-252.

[编辑校对: 贺文]