

· 论 著 ·

激光捕获显微切割技术研究胃癌 hMSH2 基因突变与蛋白表达的关系*

刘 连¹, 王丽珍², 李春鸣^{3△}

(1. 遵义医学院组织学与胚胎学教研室, 贵州遵义 563003; 2. 皖南医学院病理学教研室, 安徽芜湖 241002; 3. 遵义医学院附属医院病理科, 贵州遵义 563003)

摘要:目的 通过对胃癌组织中错配修复基因 hMSH2 基因蛋白表达、hMSH2 基因突变关系的研究, 探讨错配修复基因 hMSH2 基因与胃癌临床病理特征的关系和意义及其导致胃癌的可能机制。方法 (1)应用免疫组织化学 SP 法检测 45 例胃癌组织 hMSH2 基因蛋白表达情况。(2)激光捕获显微切割设备直接获取胃癌细胞。(3)应用聚合酶链反应-单链构象多态性分析 (PCR-SSCP)-银染技术, 分别检测 45 例胃癌组织中 5 个外显子 hMSH2 基因突变的情况。结果 (1)45 例胃癌组织中 hMSH2 基因蛋白表达阴性 9 例 (20.00%), 阳性 36 例 (80.00%)。hMSH2 基因蛋白表达阴性率与患者的年龄、性别、发生部位、有无淋巴结转移、组织学类型、分化程度及进展程度均无相关性 ($P > 0.05$)。(2)45 例胃癌组织中, hMSH2 基因突变共 4 例 (8.89%)。hMSH2 基因突变率与胃癌患者的年龄、性别、发生部位、有无淋巴结转移、组织学类型、分化程度及进展程度均无相关性 ($P > 0.05$)。(3)hMSH2 基因蛋白表达阴性的胃癌组有 4 例 hMSH2 基因突变 (44.44%), hMSH2 基因蛋白表达阳性的胃癌组见 hMSH2 基因突变 0 例 (0.00%), hMSH2 基因蛋白表达阴性胃癌组 hMSH2 基因突变率与 hMSH2 基因蛋白表达阳性组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论 hMSH2 基因突变可能参与胃癌的发生, 且可能是引起胃癌中该蛋白表达缺失原因之一。

关键词: 胃肿瘤激光捕获显微切割技术; hMSH2 基因; 蛋白表达; 基因突变; 免疫组织化学

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.01.004

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)01-0011-03

The study of expression and mutation of gene hMSH2 and correlation of them in gastric carcinoma*

Liu Lian¹, Wang Lizhen², Li Chunming^{3△}

(1. Department of Histology and Embryology, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China; 2. Department of Pathology, Wan Nan Medical College, Wuhu, Anhui 241002, China; 3. Department of Pathology, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China)

Abstract: Objective To study the expression and mutation of mismatch repair gene hMSH2 and correlation of them in gastric carcinoma, to evaluate their clinicopathological characteristics and the possible mechanism of carcinogenesis caused by hMSH2. **Methods** (1) 45 cases of gastric carcinoma were examined. The expression of hMSH2 protein was examined by immunohistochemistry. (2) The cells of gastric carcinoma were got through laser capture microdissection. (3) 45 cases of gastric carcinomas were studied respectively with five exons of hMSH2 gene emutation by using polymerase chain reaction (PCR), single strand conformation polymorphism (SSCP) and silver-staining. **Results** (1) In 45 cases of gastric carcinoma, the negative expression rate of hMSH2 protein was 20.00% while the positive expression rate was 80.00%. No significant association was observed between hMSH2 protein expression and patient's age, gender, part, lymph node metastases, histological type, differentiation and stage of pathology ($P > 0.05$). (2) In 45 cases of gastric carcinoma, five exons mutation rate of hMSH2 gene was 8.89% and not significantly associated with gender, age, part, lymph node metastases and histologic type, differentiated grade and stage of clinical pathology ($P > 0.05$). (3) The hMSH2 gene mutation rates of the gastric carcinoma with the hMSH2 protein negative expression and with the hMSH2 protein positive expression were 44.44% and 0.00% respectively. There were significant difference between them ($P < 0.01$). **Conclusion** hMSH2 gene mutation may be involved into the pathogenesis of gastric carcinoma and cause depressed expression of hMSH2 protein.

Key words: stomach neoplasms; laser capture microdissection; hMSH2 gene; mutation; immunohistochemistry

胃癌是人类最常见的恶性肿瘤之一, 因此, 寻找能够预示胃癌的特异性指标, 并对此开展针对性的预防、治疗, 将会使胃癌患者的生存率得到明显提高。错配修复基因 (mismatch repair gene, MMR gene) 是一组高度保守的管家基因, 主要功能是通过其编码蛋白, 在 DNA 复制时修复出现的碱基错配, 保持基因复制过程的高保真性和遗传的忠实性。其中, hMSH2、hMLH1、hPMS1 和 hPMS2 等基因与人类 DNA 错配修复反应有关^[1-2]。以往对 hPMS2 基因的研究多停留在蛋白表达的水平

上^[3-5]。本实验拟从基因突变的角度, 结合 hPMS2 基因蛋白表达, 并通过激光捕获显微切割设备, 从胃癌组织中简便、快捷地识别并捕获癌细胞, 避免异质细胞对实验结果的干扰, 来研究胃癌中 hMSH2 基因突变和蛋白表达的关系, 探讨 hMSH2 基因与胃癌临床病理特征的关系和意义及其导致胃癌的可能机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 标本取自 2000 年 12 月至 2005 年 12 月遵义医学院附属医院病理科诊断的各型胃癌石蜡包埋组织, 依据

HE 染色选取含癌组织较多的蜡块且证实术前未接受放、化疗,共 45 例,其中男 27 例,女 18 例;年龄 32~78 岁,平均 56.23 岁,50 岁以上 34 例,50 岁以下 11 例。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学检测 抗 hMSH2 单克隆抗体购自(美国 Calbiochem 公司,稀释度 1:50),SP 试剂盒和 DAB 染色剂均购自北京中山生物技术有限公司。免疫组织化学前进行常规 HE 染色,用免疫组织化学 SP 法检测胃癌组织 hMSH2 基因蛋白的表达情况。用已知的阳性片作阳性对照,磷酸盐缓冲液代替一抗作阴性对照,按 SP 试剂盒染色步骤进行操作。

1.2.2 DNA 样品的制备 用于激光捕获显微切割(laser capture microdissection,LCM)石蜡切片的制备与常规病理切片基本相同,经常规 HE 染色,最后不封片。然后用激光捕获显微切割设备,将含胃癌细胞丰富的区域调节至视野中心,在需要切割胃癌细胞的外沿移动鼠标箭头,发射激光脉冲,使其与周围组织分离,并检查收集管的盖中是否有所需的细胞,如此多次重复这一过程,直至捕获到足够的细胞。发射激光束前要分别调节激光束的粗细、激光的能量和激光束移动的速度,从而调节激光切割的质量。本实验一般用下列条件获取胃癌细胞,Aperture2、Intensity34 和 Speed6,一次取 5~50 个胃癌细胞,每管至少取 1 000 个细胞(封 2 图 1、2)。

1.2.3 聚合酶链反应-单链构象多态性分析(PCR-SSCP)-银染技术 分别检测 45 例胃癌组织中,第 4、5、6、11、13 外显子的 hMSH2 基因突变情况。(1)用石蜡包埋组织 DNA 抽提试剂盒(德国 Qiagen 公司),抽提 DNA,置于 -20 °C 冰箱内保存。对照组正常胃组织 DNA 抽提过程同上。(2)PCR 反应体系:0.5~1 μg DNA 模板,25 μmol/L 引物各 2 μL,10 mmol/L dNTP 1 μL,1 U TaqDNA 聚合酶,10 × buffer 5 μL,25 mmol/L MgCl₂ 5 μL,以高压蒸气消毒之双蒸水加至 50 μL。PCR 反应条件:94 °C 预变性 5 min,于 4 min 时加 Taq 酶,94 °C 变性 40 s,退火 1 min,72 °C 延伸 40 s,32 个循环,最后一个循环延伸 3 min。引物由上海生物技术工程有限公司合成。每组 PCR 扩增以正常胃组织做对照,并设空白对照,以超纯水代替模板组 DNA。(3)PCR 产物以 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定,若条带满意,则进行 10%~12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳结束后银染分析结果。(4)采用全自动凝胶成像分析系统,利用软件 Genesnap 获取图像。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行处理分析,各组间差异采用 χ^2 检验或确切概率法检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

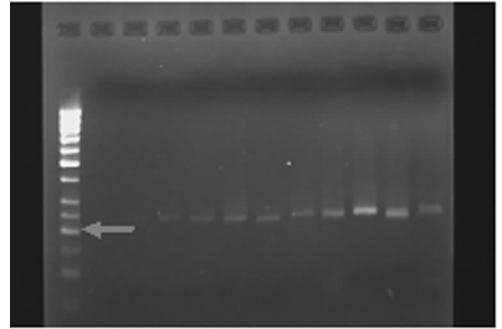
2.1 免疫组织化学检测结果 hMSH2 基因蛋白以细胞核呈棕黄色颗粒为阳性表达,计数 500 个细胞,以阳性细胞占癌细胞 20% 以上者为阳性(封 2 图 3、4)。本实验结果显示,45 例胃癌组织中,hMSH2 蛋白表达阴性 9 例(20.00%),阳性 36 例(80.00%)。hMSH2 蛋白在胃癌组织中阴性表达率为 20.00% (9/45),胃癌中 hMSH2 蛋白表达阴性率与胃癌患者的年龄、性别、发生部位、淋巴结有无转移、组织学分型、分化程度、病理变化及进展程度均无显著性相关($P > 0.05$)。

2.2 PCR-SSCP-银染检测结果 (1)hMSH2 基因各外显子进行 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳(图 5)。(2)hMSH2 基因各外显子进行 PCR-SSCP 检测后的突变结果(图 6)。

2.3 胃癌中 hMSH₂ 基因突变检测结果与临床病理特征的关系 (1)45 例胃癌组织中,hMSH2 基因突变共 4 例(8.89%),

第 4 外显子 1 例,第 6 外显子 2 例,第 11 外显子 1 例,第 5 和第 13 外显子未见突变。(2)hMSH2 基因突变率与胃癌患者的年龄、性别、发生部位、有无淋巴结转移、组织学类型、分化程度及进展程度均无相关性($P > 0.05$),见表 1。(3)hMSH2 蛋白表达阴性的胃癌组中,hMSH2 基因突变率为 44.44% (4/9);hMSH2 蛋白表达阳性的胃癌组中,hMSH2 基因突变率为 0.00% (0/36)。经统计学分析差异有统计学意义($P < 0.01$),即 hMSH2 蛋白表达阴性胃癌组 hMSH2 基因突变率明显高于 hMSH2 蛋白表达阳性组,见表 2。

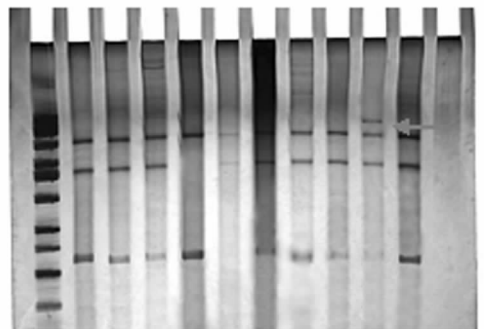
M N1CC C CC CC CC N2



M 代表 Marker,N1 代表空白对照,N2 为正常胃组织,C 为胃癌组织;箭头所指为 200 bp;hMSH2 外显子 11(238 bp)。

图 5 PCR 扩增产物琼脂糖电泳图

M N2C C C CC C C C



M 代表 Marker,N1 代表空白对照,N2 为正常胃组织,C 为胃癌组织;箭头所指为突变带。

图 6 hMSH2 外显子 11 PCR-SSCP 分析

表 1 胃癌中 hMSH2 基因突变与临床病理特征的关系

临床病理指标	阳性(n)	阴性(n)	χ^2	P
年龄(岁)				>0.05
≤50	1	10		
>50	3	31		
性别			0.011	>0.05
男	3	24		
女	1	17		
发生部位			1.247	>0.05
贲门	0	2		
胃体	2	12		
胃窦	2	27		
淋巴结转移			0.740	>0.05
有	1	25		
无	3	16		
组织学分型			0.364	>0.05
乳头状及管状腺癌	2	17		

续表 1 胃癌中 hMSH2 基因突变与临床病理特征的关系

临床病理指标	阳性(n)	阴性(n)	χ^2	P
低分化腺癌	1	12		
印戒细胞癌及黏液腺癌	1	12		
分化程度			1.085	>0.05
高分化	2	11		
中分化	0	6		
低分化	2	24		
病理变化进展程度			—	>0.05
早期胃癌	1	9		
进展期胃癌	3	32		

表 2 胃癌中 hMSH2 蛋白表达与突变的关系

hMSH2 蛋白表达	hMSH2 基因突变数		合计
	突变	未突变	
—	4	5	9
+	0	36	36
合计	4	41	45

3 讨 论

近年来的研究表明,错配修复基因的突变也参与了肿瘤的发病机制,并且可能是肿瘤发生的早期分子事件^[6-9]。

本研究发现胃癌中 hMSH2 蛋白表达阴性率与胃癌患者的年龄、性别、发生部位、淋巴结有无转移、组织学分型、分化程度、病理变化及进展程度均无显著性相关($P>0.05$)。这一结果与 Kitajima 等^[10]的研究结果不同。Kitajima 等^[10]在研究胃癌时亦发现:在病理分化程度较好与分化程度差的肿瘤组织中 MMR 基因蛋白表达水平不同,前者 hMLH1 基因和 hMSH2 蛋白表达水平高于后者,其中 hMSH2 蛋白在低龄患者组中的表达率较低。这可能与本实验样本量较小有关,需加大样本量继续研究。

另外,本实验中,hMSH2 蛋白表达阴性胃癌组 hMSH2 基因突变率明显高于 hMSH2 蛋白表达阳性组,差异有统计学意义($P<0.01$)。从以上结果可以推测,导致胃癌的分子机制为:(1)hMSH2 蛋白表达缺失与部分胃癌的发生有关,hMSH2 蛋白表达缺失可能是诊断胃癌的有用指标之一。(2)hMSH2 基因突变可能参与胃癌的发生,且可能是引起胃癌中该蛋白表达缺失的原因之一,进而使细胞修复错配碱基的功能降低。

综上所述,推测胃癌发病原因,可能是 hMSH2 基因本身发生了改变或功能降低时,DNA 复制时出现的错配得不到及时纠正,导致某些原癌基因和抑癌基因中的突变得快速积累^[11-14],进而影响正常细胞的增殖、调控。而 MMR 基因功能的降低,又使得这些细胞恶性转化的风险提高,最终会因为 MMR 基因的功能完全丧失而导致肿瘤的发生。

参考文献:

[1] Kim HG, Lee S, Kim DY, et al. Aberrant methylation of DNA mismatch repair genes in elderly patients with sporadic gastric carcinoma: A comparison with younger patients[J]. J Surg Oncol Jan, 2010, 101(1): 28-35.
 [2] Demokan S, Suoglu Y, Demir D, et al. Microsatellite insta-

bility and methylation of the DNA mismatch repair genes in head and neck cancer[J]. Ann Oncol, 2006, 17(6): 995-999.
 [3] 刘连,王丽珍,李春鸣. 胃癌组织中 hMSH2 蛋白表达与幽门螺杆菌感染的关系[J]. 遵义医学院学报, 2006, 29(1): 18-20.
 [4] Li M, Liu LN, Wang ZH, et al. Overexpression of hMSH2 and hMLH1 protein in certain gastric cancers and their surrounding mucosae[J]. Oncol Rep Feb, 2008, 19(2): 401-406.
 [5] Betge J, Pollheimer MJ, Schlemmer A, et al. Gastric cancer and concomitant renal cancer: A systematic immunohistochemical and molecular analysis[J]. Oncol Rep, 2011, 26(3): 567-575.
 [6] Koessler T, Oestergaard MZ, Song H, et al. Common variants in mismatch repair genes and risk of colorectal cancer[J]. Gut Aug, 2008, 57(8): 1097-1101.
 [7] Feitsma H, Raoul V, Kuiper, et al. Zebrafish with mutations in mismatch repair genes develop neurofibromas and other tumors[J]. Cancer Res, 2008, 68(13): 5059-5066.
 [8] Leeanne JM, Mark AJ, Joanne Y, et al. Microsatellite instability markers for identifying early-onset colorectal cancers caused by germ-line mutations in DNA mismatch repair genes[J]. Clinical Cancer Research, 2007, 13(10): 2865-2869.
 [9] Jenkins MA, Baglietto L, Dowty JG, et al. Cancer risks for mismatch repair gene mutation carriers: a population-based early onset case-family study[J]. Clin Gastroenterol Hepatol, 2006, 4(4): 489-498.
 [10] Kitajima Y, Miyazaki K, Matsukura S, et al. Loss of expression of DNA repair enzymes MGMT, hMLH1, and hMSH2 during tumor progression in gastric cancer[J]. Gastric Cancer, 2003, 6(2): 86-95.
 [11] Gu M, Kim D, Bae Y, et al. Analysis of microsatellite instability, protein expression and methylation status of hMLH1 and hMSH2 genes in gastric carcinomas[J]. Hepatogastroenterology, 2009, 56(9): 899-904.
 [12] Amy JF, Daniel JS, Lawrence J, et al. Prognostic significance of defective mismatch repair and BRAF V600E in patients with colon cancer[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(24): 3408-3415.
 [13] Pinto M, Wu Y, Mensink RG, et al. Somatic mutations in mismatch repair genes in sporadic gastric carcinomas are not a cause but a consequence of the mutator phenotype[J]. Cancer Genet Cytogenet, 2008, 180(2): 110-114.
 [14] Mario EB, Barry R, Anthony F, et al. Endometrial cancer risk is associated with variants of the mismatch repair genes MLH1 and MSH2 [J]. Cancer Epidem Biomar, 2006, 15(9): 1636-1640.