

·基础研究·

子宫内膜癌错配修复基因 hMLH1 的表达 和启动子甲基化研究

舒珊荣¹, 柯佩琪^{1*}, 李小毛², 李美香³, 王莉³, 费慧¹

(中山大学 1. 附属第一医院妇产科; 2. 附属第三医院妇产科; 3. 肿瘤防治中心, 广东 广州 510630)

摘要:【目的】探讨子宫内膜癌组织中错配修复基因 hMLH1 的表达和启动子甲基化状态与子宫内膜癌发生的关系。【方法】应用免疫组化链霉素抗生物素-过氧化物酶法(S-P法)和甲基化特异性聚合酶链反应(MSP)方法,检测 37 例子宫内膜癌组织和 20 例正常增生期子宫内膜组织中 hMLH1 蛋白的表达和启动子甲基化状态。【结果】37 例子宫内膜癌组织和 20 例正常增生期子宫内膜组织 hMLH1 基因蛋白表达分别为 51.4%(19/37), 85%(17/20); 基因启动子甲基化分别为 43.2%(16/37), 15%(3/20)。发生甲基化的 16 例子宫内膜癌组织 14 例蛋白表达阴性, 发生甲基化的 3 例正常增生期子宫内膜组织 2 例蛋白表达阴性。hMLH1 蛋白表达与组织学分级(G1, G2, G3)有关, 与肿瘤肌层浸润、淋巴结转移、国际妇产科协会(FIGO)分期和宫颈浸润无相关性, hMLH1 的甲基化与上述临床病理因素均无相关性。【结论】hMLH1 基因启动子甲基化与其蛋白表达缺失密切相关, hMLH1 基因在子宫内膜癌的发生过程中发挥重要作用。

关键词: 子宫内膜癌; hMLH1 基因; 表达; 启动子甲基化

中图分类号: R71 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-3554(2009)03-0241-05

Mismatch Repair Gene hMLH1 Expression and Promoter Methylation in Endometrial Carcinoma

SHU Shan-rong¹, KE Pei-qi^{1*}, LI Xiao-mao², LI Mei-xiang³, WANG Li³, FEI Hui¹

(1. Department Of Gynecology and Obstetrics, The First Affiliated Hospital;

2. Department Of Gynecology and Obstetrics, The Third Affiliated Hospital;

3. Cancer Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: 【Objective】 To explore the correlation between the mismatch repair gene hMLH1 protein expression and promoter methylation with endometrial carcinoma. 【Methods】 The protein expression of hMLH1 and the status of promoter methylation were detected by immunohistochemistry and methylation specific PCR (MSP) in the tissues of endometrial carcinoma and normal proliferative endometrium. 【Results】 The protein expression rate of hMLH1 was 51.4% (19/37) in endometrial carcinoma and 85% (17/20) in normal proliferative endometrium, respectively. The DNA methylation rate was 43.2% (16/37) and 15% (3/20) in endometrial carcinoma and normal proliferative endometrium, respectively. The hMLH1 was not expressed in 14 of 16 methylated cases of endometrial carcinoma and 2 of 3 methylated cases of normal proliferative endometrium. The protein expression of hMLH1 was correlated with histological grade (G1, G2, G3) of endometrial carcinoma. No correlation was found between muscular layer invasion, lymph metastasis, FIGO stage and cervical invasion with hMLH1 protein expression. hMLH1 methylation did not correlate with such clinicopathological characteristics. 【Conclusions】 hMLH1 methylation was associated with the absence of hMLH1 protein expression. The hMLH1 involved in carcinogenesis of endometrial carcinoma.

Key words: endometrial carcinoma; hMLH1 gene; expression; promoter methylation

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2009, 30(3):241-245]

收稿日期: 2008-11-29

基金项目: 广东省科技攻关项目(2005B34201022)

作者简介: 舒珊荣, 在职博士研究生, 从事妇科肿瘤研究; * 通讯作者, 柯佩琪, E-mail: kepei qi@mail.sysu.edu.cn

近年来子宫内膜癌的发病率有所上升,其确切发病机理至今仍不十分清楚。随着分子生物学的发展和广泛应用,子宫内膜癌分子遗传学特征已逐渐被人们所了解。目前普遍认为子宫内膜癌的发病是一个涉及多基因、多步骤的复杂过程。多个癌基因激活、抑癌基因失活的致癌模式逐渐为人们所认识。抑癌基因可通过突变和染色体缺失而失活,CpG岛甲基化也是肿瘤抑癌基因失活的途径之一。错配修复基因hMLH1是细胞内错配修复系统的重要组成部分,其功能缺失导致碱基错配不能得到有效的修复,突变累积,导致肿瘤的发生。研究发现hMLH1突变与卵巢癌、子宫内膜腺癌及胃癌均有关。同时,在多种散发性肿瘤中,hMLH1表达异常主要与启动子区CpG岛的高甲基化有关。甲基化特异性PCR克服了以往甲基化状态研究方法的局限性,即使肿瘤组织中混有正常组织也不完全影响结果,而且只需要很少量的DNA,具有简单、敏感、高效的特点。故本实验应用甲基化特异性PCR(methylation-specific PCR)和免疫组化链霉素抗生物素-过氧化物酶染色法(S-P法),检测子宫内膜癌及正常增生期子宫内膜组织hMLH1基因的DNA甲基化以及该基因蛋白的表达情况,旨在探讨hMLH1基因与子宫内膜癌发病机制的关系。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集2004年3月~2006年10月在中山大学附属第一医院妇科住院手术治疗的子宫内膜癌患者37例,同期因子宫肌瘤住院行全子宫切除患者的正常的增生期子宫内膜组织20例,新鲜组织在离体后即放入液氮内保存。所取标本均经病理证实。按国际妇产科协会(Federal Institute of Gynecology and Obstetrics, FIGO)2000年标准进行手术-病理分期,子宫内膜癌期20例,期9例,期6例,期2例。其中高分化有22例,中分化有13例,低分化有2例。患者年龄24~69岁,平均年龄49.4岁。患者术前均未行化疗、放疗、免疫、激素治疗等抗肿瘤治疗。

1.2 组织基因组DNA提取和DNA亚硫酸钠处理

组织基因组DNA提取试剂盒购自北京TIANGEN生物技术有限公司,按照试剂盒的说明

提取标本的基因组。亚硫酸修饰DNA的方法^[1]: 1 μg DNA溶于50 μL的水中,加入NaOH(终末浓度为0.2 mol/L),37℃变性10 min,再加入10 mmol/L的氢醌30 μL(Sigma公司)和3 mol/L亚硫酸氢钠(Sigma公司,pH 5.0)520 μL,混匀后加矿物油50℃孵育16 h。应用Wizard DNA纯化柱(Promega公司)纯化修饰DNA;纯化后的DNA再用NaOH(终末浓度为0.3 mol/L)于室温下处理5 min,乙醇沉淀,回收沉淀的DNA溶于30 μL的水中,-80℃储存备用。

1.3 甲基化和非甲基化聚合酶连反应

亚硫酸氢钠修饰的DNA进行巢式PCR,检测组织hMLH1基因是否甲基化。修饰的DNA经首轮PCR放大hMLH1基因的CpG岛,PCR引物为:5'-GGAGTGAAGGAGGTTAYGGGTAAGT-3'(forward),5'-AAAAACRATAAAAACCCTATACCTAATC-3'(reverse)。PCR扩增片断为182 bp。

第一轮PCR产物经过50倍稀释后作为第二轮PCR反应的模板。其中甲基化聚合酶连反应(Methylation-Specific PCR, MSP)引物为:5'-ACGTAGACGTTTTATTAGGGTCCG-3'(forward),5'-CCTCATCGTAACTACCCGCG-3'(reverse)。非甲基化PCR(Un-Methylation-Specific PCR, UMP)引物为:5'-TTTTGATGTAGATGTTTTATTAGGGTTGT-3'(forward),5'-ACCACCTCATCATAACTACCCCA-3'(reverse)。

两轮PCR反应体系都为30 μL。第一轮PCR的条件:94℃预变性5 min,94℃变性30 s,56℃退火30 s,72℃延伸30 s循环40次,72℃再延伸5 min。第二轮PCR的退火温度为61℃,循环25次。PCR产物采用2%的琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察并成像。第二轮PCR产物大小分别为115 bp(MSP)和124 bp(UMP)。

1.4 免疫组化

组织标本经福尔马林固定,石蜡包埋标本,制成4 μm的切片。将切片脱蜡,水化,浸入30 mL/L的H₂O₂溶液中,置于室温下10 min,封闭内源性过氧化物酶。再置于pH 6.0的0.01 mol/L枸橼酸缓冲液中,微波炉加热修复抗原。将切片置于5 mL/L的牛血清白蛋白中孵育5 min,减少非特异性染色。滴加第一抗体:鼠抗人hMLH1蛋白单克隆抗体(购自Zymed laboratories Inc)约20 μL,工作浓度1:50,4℃孵育过夜。PBS洗涤,滴加生物素

标记的第二抗体,置于 37 ℃ 孵育 30 min, PBS 洗涤,滴加过氧化物酶标记的链霉素抗生物素蛋白,置于 37 ℃ 孵育 30 min, PBS 洗涤, DAB 显色。蒸馏水冲洗,苏木素复染。中性树胶封片显微镜下观察。

hMLH1 蛋白产物表达特征:正常细胞 hMLH1 阳性表达主要定位于细胞核,呈棕黄色,而且各种病变组织中 hMLH1 基因产物的表达特征基本相同。每例均随机观察 5 个视野($\times 200$),参照文献报道的判定方法进行计数:阳性着色细胞数 $\geq 10\%$ 为阳性表达,阳性着色细胞数 $<10\%$ 为阴性表达。在高倍视野下拍照($\times 400$)。

1.5 统计学方法

试验结果采用 SPSS 11.0 统计软件对所得数据进行分析。两种不同的组织标本进行比较,采用 Chi-square 检验或 Fisher 精确概率检验进行分析。检验水准 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 认为差异有显著性。

2 结果

2.1 两种组织 hMLH1 蛋白表达的比较

hMLH1 蛋白在子宫内膜癌肿瘤组织的表达率为 51.40% (19/37), 在正常的增生期内膜组织表达率为 85.00% (17/20)。两者之间差异具有显著统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1)。

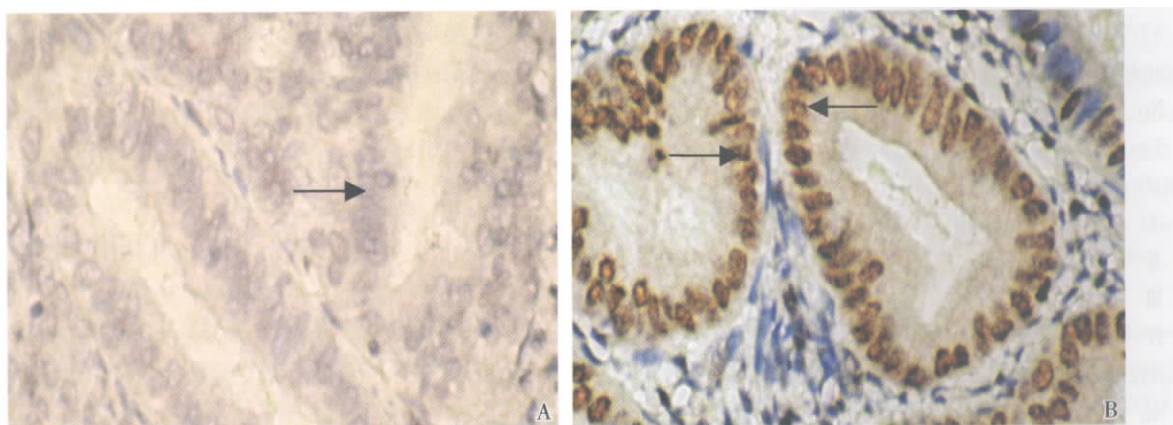


图 1 错配修复基因 hMLH1 在子宫内膜癌组织或正常子宫内膜组织中的表达

Fig.1 Positive expression of mismatch repair gene hMLH1 in endometrial carcinoma or normal endometrium

A: Negative expression in carcinoma, HE $\times 400$; B: Positive expression in normal endometrium, HE $\times 400$

2.2 两种组织 hMLH1 基因甲基化率的比较

在子宫内膜癌肿瘤组织中, hMLH1 基因的甲基化率为 43.2% (16/37), 在正常的子宫内膜组织中的甲基化率为 15.0% (3/20)。肿瘤组织中 hMLH1 的甲基化率明显高于正常的子宫内膜组织, 两者之间差异具有显著统计学意义 ($P < 0.05$, 图 2)。

2.3 两种组织中 hMLH1 的甲基化与蛋白表达的关系

子宫内膜癌组织中检测到的 16 例 hMLH1 甲基化阳性的组织有 2 例, hMLH1 蛋白表达阳性 (表达率 12.5%), 未发生甲基化的 21 例中有 17 例表达 hMLH1 蛋白表达 (表达率 80.9%), 两者之间具有相关性 ($P < 0.05$)。正常子宫内膜组织中检测到的 3 例发生甲基化的组织有 1 例蛋白表达 (表达率为 33.3%), 未发生甲基化的 17 例中有 16

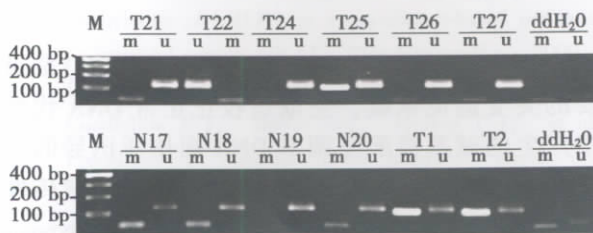


图 2 错配修复基因 hMLH1 在正常子宫内膜组织及癌组织中甲基化图

Fig.2 The methylation picture of mismatch repair gene hMLH1 both in normal endometrium and in endometrial carcinoma

T: Tumor; N: Normal endometrium; m: Methylation; u: Unmethylation

例表达阳性 (表达率 94.1%), 两者之间具有相关性 ($P < 0.05$)。

2.4 临床病理因素与 hMLH1 蛋白表达及 DNA 甲基化的关系

hMLH1 蛋白表达与组织学分级(G1, G2, G3)有关($P < 0.05$),但与其它临床病理因素:肿瘤肌

层浸润、淋巴结转移、FIGO 分期和肿瘤宫颈浸润无相关性($P > 0.05$)。hMLH1 的甲基化与组织学分级、肿瘤肌层浸润、淋巴结转移、FIGO 分期和肿瘤宫颈浸润均无相关性($P > 0.05$,表 1)。

表 1 临床病理因素与 hMLH1 的甲基化及蛋白表达的关系

Table 1 Correlation between clinicopathological factors with methylation and protein expression

Clinic parameters	Total	hMLH1 methylation		P	hMLH1 protein expression		P
		Positive	Negative		Positive	Negative	
Histological grade							
G1	22	9	13		15	7	
G2	13	6	7		4	9	
G3	2	1	1	0.937	0	2	0.033
Myometrium invasion							
<1/2	30	12	18		16	14	
>1/2	7	4	3	0.437	3	4	0.693
Lymph metastasis							
No	33	15	18		18	15	
Yes	4	1	3	0.618	1	3	0.340
FIGO stage							
	20	9	11		14	6	
	9	4	5		3	6	
	6	2	4		2	4	
	2	1	1	0.957	0	2	0.077
Cervix invasion							
No	28	20	8		15	13	
Yes	9	6	3	1.000	4	5	0.714

3 讨论

DNA 错配修复(mismatch repair, MMR)是重要的突变避免系统,它通过校正正常 DNA 代谢中产生的碱基错配及调节 DNA 损伤所诱导的凋亡来维持基因组的稳定性^[2]。它首先是在遗传性非息肉性结直肠癌综合征(hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome, HNPCC)中发现,HNPCC 患者家族成员中常携带错配修复基因改变,该改变是子宫内膜癌最常见的分子缺陷机制^[3]。错配修复基因 hMLH1 缺陷携带者患子宫内膜癌的风险为 42%,甚至超过患结肠癌的风险(30%)^[4]。

3.1 hMLH1 甲基化或蛋白表达与子宫内膜癌的关系

本研究应用 MSP 和免疫组化方法研究子宫内膜癌组织和正常宫内膜组织 hMLH1 的甲基化状

态与蛋白表达的关系。结果发现与正常宫内膜组织相比,子宫内膜癌组织 hMLH1 基因蛋白表达率减少,DNA 甲基化率增加,其差异均具有统计学意义。提示 hMLH1 基因甲基化和蛋白表达缺失,参与了子宫内膜癌的发生发展。该研究与 hMLH1 基因甲基化在肝癌中的研究结果相同^[5]。hMLH1 蛋白表达减少,DNA 复制过程的错误不能纠正,有助于导致子宫内膜癌的发生。

3.2 hMLH1 甲基化与蛋白的关系

癌组织中 18 例 hMLH1 蛋白表达阴性,其中 14 例就存在 hMLH1 的 DNA 甲基化;正常组织中 3 例 hMLH1 蛋白表达阴性,其中 2 例甲基化;提示 hMLH1 的甲基化导致蛋白表达缺失,此结果同其他研究结果。在本组病例中,4 例癌组织中和 1 例正常组织,hMLH1 蛋白表达缺失,但 hMLH1 的甲基化阴性,说明 hMLH1 蛋白表达缺失还有其它机制,包括点突变、缺失、插入、读码框架移位。在

其它恶性肿瘤包括结肠癌、胃癌、大肠癌、乳腺癌和卵巢癌等, DNA 甲基化也是 hMLH1 基因失活的常见方式^[6-9]。本研究 16 例甲基化的癌组织中有 2 例蛋白表达阳性, 同时 3 例甲基化的正常组织中 1 例蛋白表达阳性, 此结果可能与肿瘤的异质性有关, 或者仅仅在等位基因的一个基因发生了甲基化修饰。

3.3 hMLH1 蛋白与临床参数的关系

本研究发现, hMLH1 蛋白在子宫内膜癌不同病理分化程度中的表达差异有统计学意义, 且 hMLH1 表达阳性者均为中、高分化型(G1、G2); 虽然 hMLH1 蛋白表达与子宫内膜癌的淋巴结转移、肌层浸润、手术分期、宫颈浸润之间无统计学相关性($P > 0.05$), 但是 hMLH1 表达阳性率高者均为淋巴结无转移、宫颈无浸润、手术分期 期, 这些均是内膜癌预后良好的指标。有效的预后指标有助于临床医师采取最恰当的治疗措施。hMLH1 蛋白表达的测定有可能成为预测子宫内膜癌预后的指标。与林美芳等^[10]研究结果相似, 认为 hMLH1 的表达是的独立预后因素之一。

3.4 hMLH1 甲基化与临床参数的关系

能否利用 hMLH1 启动子甲基化与子宫内膜癌临床病理特征的关系, 来研究肿瘤的分类, 早期发现和治疗以及预测其复发转移等问题, 报道较少且观点不尽相同。Salvesen 等^[11]研究发现 hMLH1 启动子甲基化和病人年龄、FIGO 分期、组织学分级、激素受体水平均无关。而 Goodfellow^[12]研究发现 hMLH1 启动子甲基化与发病年龄和肿瘤组织学分类有关。Horowitz^[13]研究发现 hMLH1 启动子甲基化发生在子宫内膜癌的早期, 而与肿瘤转移等恶性行为无确切的联系。而学者 Black^[14]等认为伴有 hMLH1 启动子甲基化的子宫内膜癌患者有较高的总体生存率和无病存活期。因此认为 hMLH1 基因甲基化可能参与了肿瘤发生的某些早期事件, 其甲基化程度的高低可以作为评定预后的指标之一。本研究研究结果提示随着肿瘤组织分化程度的降低(从高分化到低分化), 浸润肌层的深度增加, hMLH1 甲基化率也随之增高, 但统计学上差异无显著性, 可能与病例数较少有关。

参考文献:

[1] Herman JG, Graff JR, Myohanen S, et al. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(18):9821-9826.

- [2] Gu L, Wu J, Zhu BB, et al. Deficiency of a novel mismatch repair activity in a bladder tumor cell line [J]. Nucleic Acids Res, 2002, 30(13):2758-2763.
- [3] Israel Z, Paul J G, Feng G, et al. Microsatellite instability and epigenetic inactivation of MLH1 and outcome of patients with endometrial carcinomas of the endometrioid type [J]. J Clin Oncol, 2007, 25(15):2042-2048.
- [4] 曹泽毅. 中华妇产科学 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2004:1788-2120.
- [5] 黄俊, 郑列, 王莉, 等. 肝细胞癌 hMLH1 基因甲基化与肝癌切除术后辅助性 TACE 疗效的关系 [J]. 中山大学学报:医学科学版, 2006, 27(4S):3-5.
- [6] Deng G, Peng E, Gum J, et al. Methylation of hMLH1 promoter correlates with the gene silencing with a region-specific manner in colorectal cancer [J]. Br J Cancer, 2002, 86(4):574-579.
- [7] Bevilacqua RA, Simpson AJ. Methylation of the hMLH1 promoter but no hMLH1 mutations in sporadic gastric carcinomas with high-level microsatellite instability [J]. Int J Cancer, 2000, 87(2):200-203.
- [8] Esteller M, Catus L, Matias-Guiu X, et al. hMLH1 promoter hypermethylation is an early event in human endometrial tumorigenesis [J]. Am J Pathol, 1999, 155(5):1767-1772.
- [9] Geisler JP, Goodheart MJ, Sood AK, et al. Mismatch repair gene expression defects contribute to microsatellite instability in ovarian carcinoma [J]. Cancer, 2003, 98(10):2199-2206.
- [10] 林美芳, 柯佩琪, 罗容珍, 等. 错配修复蛋白在 hMLH1 在子宫内膜癌表达的临床意义 [J]. 中山大学学报:医学科学版, 2005, 26(6):676-679.
- [11] Salvesen HB, MacDonald N, Ryan A, et al. Methylation of hMLH1 in a population-based series of endometrial carcinomas [J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(9):3607-3613.
- [12] Goodfellow P J, Buttin BM, Herzog T J, et al. Prevalence of defective DNA mismatch repair and MSH6 mutation in an unselected series of endometrial cancers [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(10):5908-5913.
- [13] Horowitz N, Pinto K, Mutch DG, et al. Microsatellite instability, MLH1 promoter methylation, and loss of mismatch repair in endometrial cancer and concomitant atypical hyperplasia [J]. Gynecol Oncol, 2002, 86(1):62-68.
- [14] Black D, Soslow RA, Levine DA, et al. Clinicopathologic significance of defective DNA mismatch repair in endometrial carcinoma [J]. J Clin Oncol, 2006, 24(11):1745-1753.

(编辑 张恩健)