

错配修复蛋白 hMLH1 在子宫内膜癌表达的临床意义

林美芳¹, 柯佩琪², 罗容珍³, 朱云晓¹, 沈宏伟²

(中山大学附属一院 1. 妇产超声科, 2. 妇产科, 广东 广州 510080; 3. 中山大学肿瘤防治中心病理科, 广东 广州 510060)

摘要:【目的】探讨错配修复蛋白 hMLH1 在子宫内膜癌(endometrial carcinoma, EC)的失表达情况及其临床意义。【方法】用免疫组化 S-P 方法检测 hMLH1 蛋白在 61 例子宫内膜癌组织的失表达情况, 并分析 hMLH1 蛋白失表达与子宫内膜癌临床病理的关系。【结果】子宫内膜癌组织存在 hMLH1 蛋白失表达, 其失表达率为 29.5%。hMLH1 失表达子宫内膜癌细胞分化较好($P=0.047$), 临床预后较好($OR=5.458$, $P=0.025$), hMLH1 失表达为子宫内膜癌独立预后因素(Cox 多因素分析, $P=0.006$)。【结论】hMLH1 基因功能缺失在子宫内膜癌代表较良好的预后, hMLH1 失表达有可能作为子宫内膜癌的独立预后因素。

关键词:子宫内膜癌; 错配修复; hMLH1

中图分类号:R737.33 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-3554(2005)06-0676-04

Clinical Significance of hMLH1 Expression in Endometrial Carcinoma

LIN Mei-fang¹, KE Pei-qi², LUO Rong-zhen³, ZHU Yun-xiao¹, SHEN Hong-wei²

(1. Department of Ultrasound, 2. Department of Obstetrics and Gynecology, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China, 3. Department of Pathology, Cancer Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract: 【Objective】To probe the molecular significance of tumor suppressor gene hMLH1 expression in the development of endometrial carcinoma (EC). 【Methods】hMLH1 expression in 61 endometrial carcinoma tissues were determined with immunohistochemical method S-P and the relationship between loss expression of hMLH1 and clinical pathology of endometrial carcinoma was analyzed. 【Results】The loss expression rate of hMLH1 in EC was about 29.5%. Loss of hMLH1 expression was observed frequently in more well-different tumor ($P=0.047$). Survival of the patients with loss of hMLH1 expression was longer (Kaplan-Meier) ($P=0.0123$). Cox analysis showed independent value of hMLH1 expression ($P=0.006$). 【Conclusion】Loss of hMLH1 function may bear a good prognosis in endometrial carcinoma patients. hMLH1 expression may serve as an independent factor in the EC prognosis.

Key words: endometrial carcinoma; DNA mismatch repair; hMLH1

[J SUN Yat-sen University (Med Sci), 2005, 26(6):676-679]

1992年在对遗传性非息肉性大肠癌(hereditary nonpolyposis colorectal cancer, HNPCC)的研究中发现了一系列能消除 DNA 复制错误, 增加染色体复制保真性的基因组—错配修复基因系统, 其功能缺陷与 HNPCC 及多种肿瘤的发生发展有关。其中此系统的中心基因 hMLH1 与 hMSH2 功能缺失是 70%–80% 的 HNPCC 发生发展的基因机制^[1]。在大肠癌、胃癌 hMLH1 功能的缺失, 代表较良好的临床预后^[2,3]。子宫内膜癌是 HNPCC 女性患者最常见的肠外肿瘤^[4], 其发生发展与 hMLH1 功能缺失的关系, 国外有零星报道, 但大部分均从基因水平研

究。为了解中国人子宫内膜癌 hMLH1 失表达情况, 以求为子宫内膜癌的预后找到一个简便、直观的生物医学指标, 本研究用免疫组化方法在蛋白水平对中国人子宫内膜癌的 hMLH1 失表达情况与临床预后关系进行了研究。

1 材料与方法

1.1 研究对象

子宫内膜癌标本选自中山大学第一附属医院病理科 1989 年 8 月 30 日至 1999 年 2 月 25 日手

收稿日期: 2005-06-29

基金项目: 广东省科委攻关基金资助项目(97017)

作者简介: 林美芳(1975-), 女, 广东河源人, 硕士, 住院医师; 柯佩琪, 硕士导师, 副教授, 通讯作者。E-mail: pqq@21cn.com

术切除, 临床资料完整的子宫内膜癌石蜡包埋组织, 共 61 例, 其中子宫内膜样腺癌 57 例, 浆液性腺癌 4 例。全部患者术前均无放疗、化疗及激素治疗史。病理分级 G1 21 例, G2 26 例, G3 14 例。临床分期采用国际妇产科联盟(FIGO)1988 年修订的临床分期标准, I 期 28 例, II 期 9 例, III 期 17 例, IV 期 7 例。肌层浸润深度: 局限于内膜 2 例, 浅肌层 30 例, 中肌层浸润 12 例, 深肌层浸润 17 例。宫颈转移 18 例。行淋巴清扫手术 49 例, 其中有转移 37 例, 无转移 12 例。肿瘤大体类型: 弥漫型 34 例, 局限型 27 例。61 例术后随访至 2003 年 12 月, 最长随访时间 145 个月, 最短随访时间 3 个月, 平均追踪时间(68±38)个月, 死亡 18 例。

1.2 研究方法

hMLH1 蛋白检测采用免疫组化链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶 (SP) 法。鼠抗人单克隆抗体 hMLH1 为美国 Pharmingen 公司产品, 工作浓度 1:25, 二氨基联苯胺(DAB)显色。hMLH1 用微波修复法(微波高火 5 min, 中低火 30 min)。hMLH1 阳性对照用已知 hMLH1 阳性的大肠癌标本, 阳性染色产物为细胞核内棕黄色颗粒。hMLH1 失表达指全部的肿瘤细胞核均呈 hMLH1 阴性反应, 而内对照的平滑肌细胞、纤维母细胞或淋巴细胞出现核阳性反应。有一个以上的肿瘤细胞核出现阳性反应即认定为 hMLH1 阳性或正常表达。若对于正常组

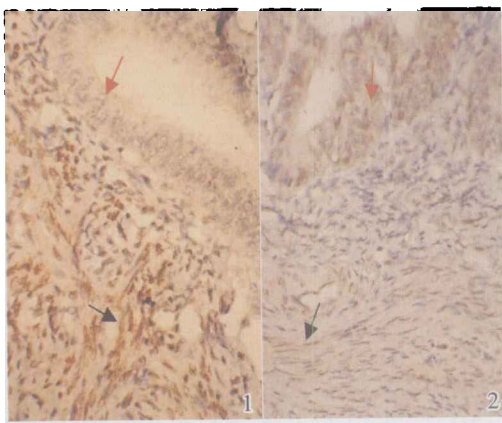


图 1 hMLH1 失表达

图 2 hMLH1 阳性表达

Fig.1 hMLH1 negative expression

Tumor cell without nuclear staining (red arrow), in the presence of normally stained myometrium cell(black arrow)(×400)

Fig.2 hMLH1 positive expression

Unequivocal nuclear stain of tumor cell (red arrow), in the presence of normally stained myometrium cell (black arrow) (×200)

织也为阴性, 则可能有错, 需要重做^[5](图 1,2)。

1.3 统计学处理

统计学处理采用 SPSS 11.0 软件包, 根据需要进行卡方检验(精确概率法), Kaplan-Meier 法绘制生存曲线, Log-Rank 检验分析, 多因素 Cox 回归。

2 结 果

2.1 hMLH1 失表达与子宫内膜癌临床病理参数的关系

61 例子官内膜癌中, hMLH1 阳性表达 43 例, 阳性率为 70.5%, 失表达共 18 例, 失表达率 29.5%。分析 61 例子官内膜癌临床病理参数与 hMLH1 表达的关系(表 1), 结果表明 hMLH1 失表达的子宫内膜癌组织分化较好。

2.2 hMLH1 与临床预后的关系

追踪 61 例子官内膜癌的生存情况并分析 hMLH1 表达与临床预后的关系。经 Log-Rank 检验, 两组间生存率差异有统计学意义($\chi^2=6.27, P=0.0123$)。Cox 单因素分析 hMLH1 表达死亡的危险系数 (OR)=5.458, 标准误 $s_2=0.757, Wald=5.031, E=1.697, P=0.025$, 结果表明 hMLH1 失表达提示临床预后好。从 Kaplan-Meier 曲线的比较也可直观地看出两条生存曲线有明显的差异(图 3)。

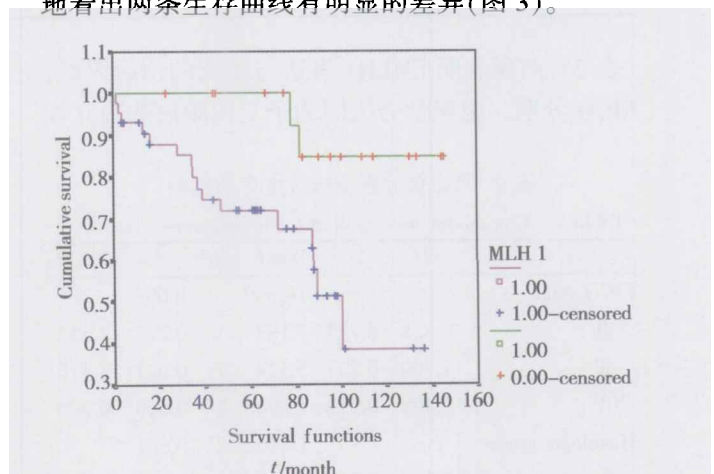


图 3 Kanplan-Meier 方法显示 hMLH1 表达与失表达的生存曲线

Fig.3 Survival curve drawn by Kanplan-Meier method shows the difference between hMLH1 negative and positive expression

2.3 Cox 分析与子宫内膜癌的预后关系

对发病年龄、hMLH1 表达、FIGO 分期、组织类型、细胞分级、浸润肌层深度、宫颈浸润、淋巴转移、大体类型、子宫大小共 10 因素, 进行 Cox 分析

表 1 hMLH1 表达与子宫内膜癌临床病理参数的关系
Table 1 hMLH1 expression state in relation to EC clinicopathology features

Variable	n	hMLH1		χ^2	P
		Negative expression	Normal expression		
Histologic type					
Endometriod	57	18	39	4.623	0.084
Serous papillary	4	0	4		
Histologic grade					
1+2	47	17	30		0.047
3	14	1	13		
Myometrial invasion					
within endometrium	2	2	0	5.248	0.129
<1/3	30	10	20		
1/2	12	3	9		
>2/3	17	3	14		
Lymph invasion					
Negative	37	12	25		0.142
Positive	12	1	11		
FIGO stage					
I	28	11	17	2.292	0.553
II	9	2	8		
III	17	4	12		
IV	7	1	6		
Cervix invasion					
Negative	42	12	30	0.057	1.000
Positive	19	6	13		

(表 2), 结果表明 hMLH1 表达与传统的预后因素: FIGO 分期、组织学分级同为子宫内膜癌的独立预

表 2 Cox 多因素分析对生存的影响

Table 2 Cox model was applied for multivariate analysis								
	B	s_z	Wald	df	P	Exp(B)		
FIGO stage			14.369	0.002				
II	0.858	0.788	1.183	1	0.277	2.357		
III	1.700	0.737	5.324	1	0.021	5.476		
IV	3.408	0.911	13.986	1	0.000	30.209		
Histologic grade			14.162	2	0.001			
2	1.188	0.791	2.258	1	0.133	3.282		
3	3.353	0.961	12.175	1	0.000	25.281		
hMLH1 expression			2.385	0.867	7.568	1	0.006	0.856

后因素。

3 讨 论

DNA 错配修复系统是人体细胞中修复 DNA 碱基错配的安全保障系统。它是由一系列特异性识别、双向切除并修复错配碱基的酶分子组成,对

保持遗传物质的完整性和稳定性,避免遗传突变的产生具有重要作用^[6]。DNA 错配修复系统功能缺陷,特别是其中心基因 hMLH1 与 hMSH2 的功能缺陷,与多种肿瘤(HNPCC、散发性大肠癌、胃癌、乳腺癌、头颈癌、神经胶质瘤等)的发生发展有关,在这些类型的肿瘤其 hMLH1 基因功能缺失代表较良好的临床预后^[2,3]。虽然子宫内膜癌的发生与 hMLH1、hMSH2 功能缺陷的关系也得到一定的论证^[7,8],但对 hMLH1、hMSH2 功能缺陷与子宫内膜癌临床病理特征及临床预后的相关研究较少。Perio 等^[9,10]用免疫组化方法检测了 89 例子宫内膜癌 hMLH1 表达情况,分析与临床病理关系,发现 hMLH1 蛋白的失表达与发病年龄、细胞分级、分期等均无关。然而 hMLH1 失表达者临床预后好,Cox 多因素分析显示 hMLH1 失表达与 FIGO 分期、细胞分级、病理类型和结构类型均为生存的独立预后因素,他们认为除了经典的临床预后指标外,hMLH1 蛋白失表达也是子宫内膜癌临床预后良好的指标。本实验免疫组化方法检测 61 份子宫内膜癌样本,检测到 hMLH1 失表达率为 29.5%,

比报道的 12.4%~22.3%稍高^[7],可能与本实验选用的单克隆抗体 G168-15 敏感性有关^[11]。我们通过分析发现 hMLH1 失表达子宫内膜癌的细胞分化较好 ($P=0.047$),hMLH1 失表达与病理组织类型、FIGO 分期、浸润肌层深度、宫颈浸润、淋巴转移等均无关系,Log-rank 检验显示 hMLH1 失表达者生存时间长,差异有统计学意义。Cox 多因素分析也表明了 hMLH1 失表达为子宫内膜癌的独立预后因素之一。因此认为 hMLH1 失表达的子宫内膜癌患者临床预后好。此结果与错配修复基因在大肠癌及胃癌失表达的意义相同^[2-3],在错配修复基因缺失的大肠癌及胃癌中具有特定的病理临床特征揭示了临床预后好的基础,如遍及整个癌组织的 Crohn's 反应及白细胞浸润,较少淋巴转移,较多淋巴反应为临床预后良好的病理基础。关于 hMLH1 失表达的子宫内膜癌患者临床预后好的机制分析,Salvesen 等^[12]认为 hMLH1 功能缺失是一部分子宫内膜癌发生的机制,沿此途径发生的子宫内膜癌常为二倍体,且不出现 P53 突变情况,我们的实验结果表明 hMLH1 失表达子宫内膜癌的细胞分化较好。同时本实验发现虽然 hMLH1 失表达在不同组织类型的表达差异不存在统计学意义,但 4 例子宫内膜浆液性腺癌中无一例出现 hMLH1 失表达。我们知道子宫内膜浆液性腺癌发病率低,临床预后极差^[13],如果增大样本量或许能发现 hMLH1 失表达在不同组织类型的表达差异,从而有助于从肿瘤发生的角度来分析 hMLH1 失表达子宫内膜癌临床预后好机制。另外如能深入研究 hMLH1 失表达与子宫内膜癌的更具体的病理特征如脉管浸润、白细胞浸润、Crohn's 反应等的关系也可能有助于了解 hMLH1 失表达子宫内膜癌临床预后好的具体机制。

总之,hMLH1 基因功能缺失在子宫内膜癌代表较良好的预后,用简便的免疫组化方法检测 hMLH1 失表达可以为子宫内膜癌的预后提供直接的生物学指标。其具体机制有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, *et al.* Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer[J]. *Nature*, 1994, 368(6468):258-61.
- [2] Cravo M, Lage P, Albuquerque C, *et al.* BAT-26 identifies sporadic colorectal cancers with mutator phenotype: a correlation with clinico-pathological features and mutations in mismatch repair genes [J]. *J Pathol*, 1999, 188(3):252-7.
- [3] dos Santos NR, Seruca R, Constancia M, *et al.* Microsatellite instability at multiple loci in gastric carcinoma: clinicopathological implications and prognosis [J]. *Gastroenterology*, 1996, 110(1): 38-44.
- [4] Sutter C, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D, *et al.* Molecular analysis of endometrial hyperplasia in HNPCC-suspicious patients may predict progression to endometrial carcinoma[J]. *Int J Gynecol Pathol*, 2004, 23(1):18-25.
- [5] 谢丹,梁雪儿,曾薇芬,等. 青年人结直肠癌 DNA 错配修复基因表达和 DNA 倍体检测 [J]. *中华病理学杂志*, 2000, 29(6):412-5.
- [6] Wu Q, Christensen LA, Legerski RJ, *et al.* Mismatch repair participates in error-free processing of DNA interstrand crosslinks in human cells [J]. *EMBO Rep*, 2005 6(6):551-7.
- [7] Orbo A, Nilsen MN, Arnes MS. *et al.* Loss of expression of MLH1, MSH2, MSH6, and PTEN related to endometrial cancer in 68 patients with endometrial hyperplasia[J]. *Int J Gynecol Pathol*, 2003, 22(2):141-8.
- [8] Martini M, Ciccarone M, Garganese G, *et al.* Possible involvement of hMLH1, P16(INK4a) and PTEN in the malignant transformation of endometriosis [J]. *Int J Cancer*, 2002, 102(4):398-406.
- [9] Peiro G, Diebold J, Lohse P, *et al.* Microsatellite instability, loss of heterozygosity, and loss of hMLH1 and hMSH2 protein expression in endometrial carcinoma [J]. *Hum Pathol*, 2002, 33(3): 347-54.
- [10] Peiro G, Diebold J, Mayr D, *et al.* Prognostic relevance of hMLH1, hMSH2, and BAX protein expression in endometrial carcinoma[J]. *Mod Pathol*, 2001, 14(8):777-83.
- [11] Chiaravalli AM, Furlan D, Facco C, *et al.* Immunohistochemistry pattern of hMSH2/ hMLH1 in familial and sporadic colorectal, gastric, endometrial and ovarian carcinomas with instability in microsatellite sequences[J]. *Virchows Arch*, 2001, 438(1): 39-48.
- [12] Salvesen HB, MacDonald N, Ryan A, *et al.* Methylation of hMLH1 in a population-based series of endometrial carcinomas [J]. *Clinical Cancer Research*, 2000, 6(9): 3607-13.
- [13] Lax SF, Kendall B, Tashiro H, *et al.* The frequency of P53, K-ras mutations, and microsatellite instability differs in uterine endometrial and serous carcinoma: evidence of distinct molecular genetic pathways [J]. *Cancer*, 2000, 88(4):814-24.

(编辑 张恩健)