

原位杂交与免疫组化技术用于评价化疗后结直肠癌患者 MLH1、MSH2 和 hMSH6 表达水平的对比研究

罗教秀, 储 兵, 曹晓珊, 黄志伟, 吴师珍, 杜 娟*

(中山大学附属中山医院病理科 528403)

摘 要: **目的** 探讨原位杂交方法和免疫组化方法两种不同方法在检测评价直肠癌术后新辅助化疗治疗后患者三种错配修复蛋白(hMLH1、hMSH2 和 hMSH6)表达水平的效果。 **方法** 选取本院收治的散发性结直肠癌(SCRC)患者 260 例,取手术切除的肿瘤组织,使用较原位杂交和免疫组化法测定 hMLH1、hMSH2 和 hMSH6 表达水平的效果,比较三种指标之间的关联性。 **结果** 不同部位的肿瘤各种特征之间未见明显差别。原位杂交法检测 hMLH1、hMSH2、hMSH6 的阳性率显著高于免疫组化检测的阳性率;免疫组化法检测结果提示 hMLH1 与 hMSH2 的表达无明显相关性,hMLH1 或 hMSH2 与 hMSH6 表达分别呈正相关;原位杂交法检测结果提示 hMLH1 与 hMSH2, hMLH1 与 hMSH6, hMSH2 与 hMSH6 表达均呈正相关。 **结论** 原位杂交法和免疫组化方法两种方法在检测评价直肠癌术后辅助化疗后患者三种错配修复蛋白 hMLH1、hMSH2 和 hMSH6 表达水平的效果中原位杂交法更优。

关键词: 原位杂交; 免疫组化; 结直肠癌; 错配修复基因蛋白

中图分类号:R735.3

文献标识码:A

A comparison of in situ hybridization and immunohistochemistry in evaluating the expression of MLH1, MSH2 and hMSH6 in colorectal cancer patients after chemotherapy

LUO Jiaoxiu, CHU Bing, CAO Xiaoshan, et al

(Department of Pathology; Zhongshan Hospital Affiliated to Zhongshan University
Guangzhou 528403, Guangdong, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the expression of three mismatch repair proteins (hMLH1, hMSH2 and hMSH6) in neoadjuvant chemotherapy patients after rectal cancer resection by two different methods of in situ hybridization and immunohistochemistry. **Methods** 260 patients suffered from sporadic colorectal carcinoma (SCRC) admitted to our hospital were studied. The expression of hMLH1, hMSH2 and hMSH6 were detected by in situ hybridization and immunohistochemistry, the correlation of hMLH1, hMSH2 and hMSH6 was compared. **Results** There was no significant difference in the tumor characteristics of different parts. The rate of positive expression of hMLH1, hMSH2 and hMSH6 detected by in situ hybridization was significantly higher than that of immunohistochemistry, respectively ($P < 0.01$). The immunohistochemistry result showed that there was no correlation between hMLH1 and hMSH2 expression, but hMLH1 or hMSH2 was positively correlated with hMSH6 expression, respectively. The expressions of hMLH1, hMSH2 and hMSH6 detected by in situ hybridization were positively correlated among the SCRC tumor tissues. **Conclusion** In situ hybridization and immunohistochemistry are two best methods to evaluate the expression of three mismatch repair proteins hMLH1, hMSH2 and hMSH6 in postoperative neoadjuvant chemotherapy patients after rectal cancer.

Key words: in situ hybridization; immunohistochemistry; colorectal cancer; mismatch repair gene protein

错配修复基因 (mismatch repair gene, MMR) 蛋白的表达缺失常见于散发性的结直肠癌 (sporadic colorectal carcinoma, SCRC) 患者中, 该病的发生、发展过程均可能存在潜在的关联, 对于 MMR 蛋白在 SCRC 中表达的具体状态以及其与临床病理参数之间的相互关联, 尚鲜有研究涉及, 而此类相关研究的结论将大大增加人们对于 SCRC 生物学行为的认识, 以及对其发病机制的深入探索^[1-3]。免疫组化技术已经是检验界非常成熟和常用的方法之一, 这种方法虽常用, 但也存在着许多问题, 如常可见临床上出现 HE 切片比较典型而免疫组化却提示阴性的案例; 近年来发展起来的原位杂交技术是利用碱基配对原理, 结合组织化学和免疫组织化学的检测技术的检测方法, 显示出自己的优势^[4-6]。本研究通过免疫组化法和原位杂交两种方法分别对 SCRC 肿瘤组织中 3 种 MMR 蛋白 (hMLH1、hMSH2 和 hMSH6) 的表达状态进行测定, 然后进行比较评价, 希望有助于为 SCRC 患者制定个体化的化疗方案, 并未判断患者预后提供参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取本院 2013 年至 2015 年间收治的 SCRC 患者 260 例, 其中男 140 例, 女 120 例; 平均年龄 (62.7±11.2) 岁; 肿瘤部位: 本研究中肿瘤右半结肠的患者有 75 例, 位于左半结肠 90 例, 直肠肿瘤患者 98 例; 从组织分化程度角度来看: 高分化腺癌患者共计 20 例, 中分化腺癌共 165 例, 低分化及黏液性腺癌 78 例; 从淋巴结转移角度统计: 研究中转移阳性病例 149 例, 转移阴性 114 例。全部患者未进行过放化疗, 手术切除肿瘤组织固定后石蜡包埋备用。全部患者知情同意。

1.2 材料与方法 研究中使用试剂均为上海长嘉生物科技有限公司, 即用型 hMLH1 鼠抗人单克隆抗体工作液 (W-0721)、即用型 hMSH2 鼠抗人单克隆抗体工作液 (W-0722) 和即用型 hMSH6 鼠抗人单克隆抗体工作液 (W-0723)。免疫组化测定使用 Benchmark XT 自动染色仪系统, 手工滴定运行方式 (手工加抗体) 完成, Olympus Dp70 图像采集分析仪完成研究中的行图像获取工作。原位杂交检测 (ISH) 法检测使用石蜡切片脱蜡后, 置于 0.8% 胃蛋白酶盐酸混合液中, 37℃ 水浴箱消化 10 min, 使用 TBS 洗 5 min, 乙醇脱水然后室温干燥。98℃ 变性

10 min 后冰浴退火, 再置于 37℃ 水浴箱中杂交 1h, 虽有 TBS 洗在洗涤 5 min, 共 3 次, 滴加碱性磷酸酶标记的地高辛抗体后, 室温放置 0.5 h, 洗涤两次后加 BCIP/NBT 并于暗处显色, 然后使用 0.3% 核固红衬染, 常规脱水后透明封片。

1.3 判断标准 结果判断标准: hMLH1、hMSH2、hMSH6 三种蛋白的表达阳性均定位于细胞核内, 所以本研究中依据染色强度和阳性细胞率来进行计算评分^[4-6]。以在 200 倍的视野下随机的 10 个视野为计数对象, 记数每个视野中正常黏膜以及肿瘤细胞的染色情况。染色强度的评价见于 0 分: 无染色, 1 分: 弱染色, 2 分: 中等染色, 3 分: 强染色。阳性细胞率: 0 为 <1%; 1 为 <25%; 2 为 <50%; 3 为 <75%; 4 为 ≥75%。最后以染色强度与阳性细胞率之和作为评分: 0~2 分: 阴性, 3~5 分: 阳性, 6~7 分: 强阳性。评价过程采取双盲法。

1.4 统计分析 应用 SPSS 18.0 统计软件包进行统计分析。计数资料采用两个 (或多个) 样本率比较的 χ^2 检验; 计量资料使用 t 检验或方差分析完成; 相关性分析采用 Spearman 等级相关分析, 检验水准 $\alpha=0.05$, 以 $P<0.05$ 为差异具有统计学差异。

2 结果

2.1 原位杂交法与免疫组化法检测指标阳性情况

如见表 1 所示, 与免疫组化 (IHC) 检测各指标的阳性率比较, 原位杂交法 (ISH) 检测 hMLH1, hMSH2, hMSH6 的阳性率较高, 分别为 65.00%, 63.46%, 61.54%。

表 1 原位杂交和免疫组化检测三种指标的阳性率对比

阳性率	hMLH1	hMSH2	hMSH6
ISH	169 (65.00) ^b	165 (63.46) ^b	160 (61.54) ^b
IHC	100 (38.46)	98 (37.69)	103 (39.62)

与 IHC 方法比较; b: $P<0.01$

2.2 两种方法检测 hMLH1、hMSH2、hMSH6 表达阳性的相关性分析

分别使用两种检测方法得出的三种指标的检测阳性率结果, 然后分别进行三种指标之间的相关性分析, 使用免疫组化法检测 hMLH1、hMSH2、hMSH6 在 SCRC 肿瘤组织中表达阳性率的相关分析。结果提示, hMLH1 与 hMSH2 的表达无明显相关性 ($r_s=0.07$, $P=0.263$), hMLH1 与

hMSH6 表达呈正相关($r_s=0.45, P<0.01$), hMSH2 与 hMSH6 表达呈正相关($r_s=0.37, P=0.004$); 而是用原位杂交法检测 hMLH1、hMSH2、hMSH6 在 SCRC 肿瘤组织中表达阳性率的相关分析结果提示 hMLH1 与 hMSH2 的表达呈正相关($r_s=0.10, P=0.033$), hMLH1 与 hMSH6 表达呈正相关($r_s=0.56, P<0.01$), hMSH2 与 hMSH6 表达呈正相关($r_s=0.63, P<0.01$) (见表 2)。患者, 男, 54 岁典型病例

图片见图 1~2。

表 2 两种方法检测 hMLH1、hMSH2、hMSH6 表达阳性的相关性分析对比

	hMLH1 与 hMSH2	hMLH1 与 hMSH6	hMSH2 与 hMSH6
ISH	0.10 ^a	0.56 ^b	0.63 ^b
IHC	0.07	0.45 ^b	0.37 ^b

a: $P<0.05$, b: $P<0.01$

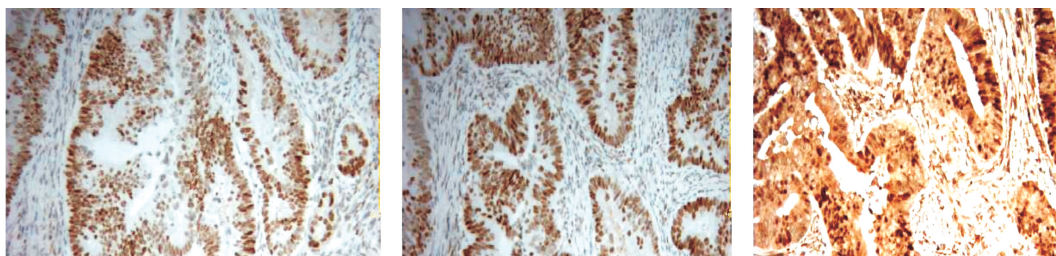


图 1 免疫组化法测定结直肠癌患者 (200×) A: MLH1, B: MSH2, C: hMSH6

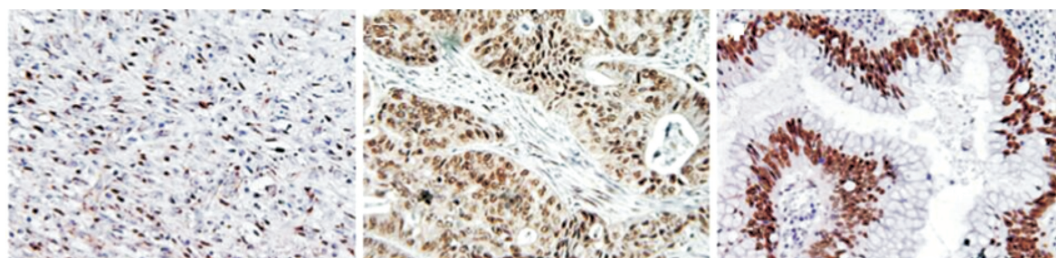


图 2 原位杂交法测定结直肠癌患者 (200×) A: MLH1, B: MSH2, C: hMSH6

3 讨 论

结直肠癌在我国发病患病近年来显著增加, 且有年轻化趋势, 明确疾病发生发展的规律对于诊断治疗作用重大, 对于诊治工作能够真正有的放矢具有重要意义。有研究提示错配修复基因的种系突变, 以及突变所引起的微卫星稳定性欠佳都可能与肿瘤的发生和发展存在潜在联系^[7-9], 本研究中使用免疫组织化学方法对 hMLH1、hMSH2、hMSH6 三个主要的错配修复基因蛋白的表达情况进行测定, 比较指标之间的相互联系, 进而间接判断 SCRC 肿瘤组织中该基因的突变情况, 结果提示, 使用免疫组化法检测 SCRC 肿瘤组织中 hMLH1、hMSH2、hMSH6 的表达阳性率, 通过相关分析发现, hMLH1 与 hMSH2 的表达无显著相关性, 而 hMLH1 与 hMSH6 的表达呈正相关关系, hMSH2 与 hMSH6 的表达也呈正相关; 同时应用原位杂交方法进行同期测定, 结

论相似, 且原位杂交法更为精准。本研究中, 阳性率分析结果提示原位杂交法检测 hMLH1 的阳性率为 65.00%, 显著高于免疫组化检测的阳性率, 检测 hMSH2 和 hMSH6 的阳性率也表现为原位杂交法的阳性率高于免疫组化检测的阳性率, 这些结果均提示原位杂交法具有较高的可信度和准确度。究其原因, 主要与原位杂交技术的原理相关, 其探针是根据碱基配对原则来完成检测的, 检测过程中因为仅与靶基因序列杂交, 所以探针—靶核酸的结合力要强于抗原—抗体的结合力, 因此在一定程度上减少了免疫组化方法中容易出现的假阳性和假阴性问题。另一方面, 原位杂交法使用福尔马林固定组织, 不会与蛋白产生交联作用, 所以 DNA 和 mRNA 蛋白质所受的影响也相对都比较小, 而免疫组化方法中组织因为使用福尔马林固定而容易产生蛋白交联, 对实验结果的影响就会比较大。从操作层面上来说原位杂交法也相对更具优势, (下转第 164 页)

- 科杂志, 2015, 30(3): 169-171.
- [2] 孙凤杰, 黄润中, 徐婧, 等. 血浆胃动素水平与早产儿喂养不耐受的相关性研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2013, 15(4): 249-253.
- [3] 中华医学会儿科学分会新生儿学组. 早产儿管理指南[J]. 中华儿科杂志, 2006, 44(3): 88-191.
- [4] 李公利, 侯晓, 周立. 极低出生体质量儿早期经口微量喂养的临床研究[J]. 中国综合临床, 2014, 30(1): 88-90.
- [5] 廖文君. 早产儿宫外发育迟缓及其相关因素 167 例分析[J]. 中国儿童保健杂志, 2014, 8(22): 847-849.
- [6] 梁德武, 刘红, 刘峰. 早期肠内外营养对早产儿生长发育的影响及意义[J]. 2015, 26(4): 830-845.
- [7] 王书书, 潘家华. 80 例早产儿早期静脉应用临床观察[J]. 安徽医药, 2011, 15(2): 216-217.
- [8] 余章斌, 韩树萍, 陈玉林, 等. 我国早产儿喂养不耐受危险因素的 Meta 分析[J]. 中华新生儿科杂志, 2010, 25(6): 346-350.
- [9] 缪晓林, 崔曙东, 郭丽敏, 等. 不同胎龄早产儿喂养不耐受危险因素[J]. 江苏医药, 2013, 12(39): 2997-2999.
- [10] Indrio F, Riezzo G, Cavallo L, et al. Physiological basis of food intolerance in VLBW[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2011, 24(S1): 64-66.
- [11] Carison SJ, Chang MI, Nandivada P, et al. Neonatal intestinal physiology and failure[J]. Semin Pediatr Surg, 2013, 22(7): 190-194.
- [12] 朱艳萍, 曹华, 刘国英. 不同胎龄不同喂养方式早产儿胃肠激素浓度变化的研究[J]. 新疆医科大学学报, 2008, 31(5): 605-607.
- [13] 沈东升, 赵艳男, 郑峰. 小剂量红霉素对不同校正胎龄早产儿早期喂养的疗效对比[J]. 中华全科医学, 2014, 11, 12(11): 1791-1792.
- [14] 徐婧, 黄润中, 黄建伟, 等. 早产儿喂养不耐受的危险因素分析[J]. 实用儿科临床杂志, 2011, 26(8): 586-588.
- [15] 王迎, 邓颖. 新生儿败血症患儿母亲围生期感染因素及其临床症状和体征分析[J]. 中国全科医学, 2013, 9(16): 3179-3182.
- [16] 张良娟, 虎崇康, 林燕, 等. 早产儿喂养不耐受肠道菌群多样性研究[J]. 中国妇幼健康研究, 2015, 26(2): 171-174.
- [17] 秦素芳. 枸橼酸咖啡因与氨茶碱治疗早产儿呼吸暂停临床疗效比较研究[J]. 儿科药物杂志, 2016, 22(2): 28-29.
- (本文编辑: 秦旭平)

(上接第 152 页)

该方法具有耗时更少, 而且操作更方便和安全的优势特征^[10-11]。

综上, 原位杂交法和免疫组化方法两种不同方法在检测评价直肠癌术后新辅助化疗治疗后患者三种错配修复蛋白 hMLH1、hMSH2 和 hMSH6 表达水平的效果中原位杂交法更优, 值得临床推广。

参考文献:

- [1] 刘艳, 孙楠, 高尚先. 原位杂交试剂盒在临床诊断领域的应用[J]. 中国生物制品学杂志, 2014, 27(7): 968-973.
- [2] 董贺, 孙青. 分子病理学技术在肿瘤诊治中的应用[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2015, 7(2): 73-77.
- [3] 张森, 陈瑛, 吴忆宁, 等. 荧光原位杂交技术的应用进展[J]. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 2014, 30(6): 90-93.
- [4] 何世斌, 柴连琴, 谭珺隽, 等. 荧光原位杂交技术的研究进展[J]. 植物科学学报, 2014, 32(2): 199-204.
- [5] 戴勇, 廖爱军, 曾斌. 超声内镜在直肠病变诊断中的应用价值[J]. 中南医学科学杂志, 2014(4): 411-413.
- [6] 于鹏飞, 顾国利, 魏学明, 等. hMLH1、hMSH2、hMSH6 在散发性结直肠癌中的表达状态与其临床病理特征的关系[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2015(5): 581-585.
- [7] 于鹏飞, 费翔, 魏学明, 等. 错配修复蛋白 hMLH1、hMSH2 和 hMSH6 在散发性结直肠癌中的表达及意义[J]. 中华普通外科学文献电子版, 2015(3): 193-197.
- [8] 陈海滨, 张国志, 李曙光, 等. hMLH1、hMSH2 和 hMSH6 在结直肠癌中的表达及临床意义[J]. 临床误诊误治, 2015(6): 85-88.
- [9] Pedroni M, Di GC, Cortesi L, et al. Double heterozygosity for BRCA1 and hMLH1 gene mutations in a 46-year-old woman with five primary tumors. [J]. Tech Coloproctol, 2014, 18(3): 285-289.
- [10] 闫海龙, 张建立, 胡顺霞, 等. 直肠癌组织中 EB 病毒的原位杂交检测[J]. 齐鲁医学杂志, 2014(3): 202-203.
- [11] 王昭辉. 分析新辅助化疗对结肠癌患者手术及预后的影响[J]. 中国卫生产业, 2014(7): 167-167.
- (本文编辑: 秦旭平)