

· 临床论著 ·

## 胃癌组织中端粒酶逆转录酶和 hMSH2 蛋白表达与幽门螺杆菌感染的关系

战淑慧 李宁 董全江 周容容 张明 郑翠玲

**【摘要】 目的** 探讨胃癌组织中 hTERT、hMSH2 基因在胃癌发生中的作用和 Hp 致癌的可能机制。**方法** 采用 W-S 法检测 93 例胃癌患者癌组织及癌旁组织中 Hp 感染情况;利用免疫组织化学方法检测 93 例胃癌患者癌组织及癌旁组织中 hTERT、hMSH2 的表达情况。**结果** (1)胃癌组织 hTERT 阳性率为 79.6%,明显高于癌旁组织 22.6% ( $P < 0.01$ );Hp 感染组 hTERT 蛋白表达阳性率高于非感染组 ( $P < 0.01$ );(2)胃癌组织 hMSH2 阳性率为 65.6%,明显高于癌旁组织 38.7% ( $P < 0.01$ );Hp 感染组 hMSH2 基因蛋白表达阳性率低于非感染组 ( $P < 0.05$ )。**结论** Hp 诱导的端粒酶的表达增高和错配修复基因 hMSH2 的表达异常可能与胃癌的发生有关。

**【关键词】** 幽门螺杆菌;胃癌

**Infection of *Helicobacter pylori* and expression of hTERT and hMSH2 in gastric carcinoma and its significance** ZHAN Shu-hui\*, LI Ning, DONG Quan-jiang, ZHOU Rong-rong, ZHANG Ming, ZHENG Cui-ling. \* Department of Gastroenterology, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao 266021, China

Corresponding author: ZHAN Shu-hui, Email: zhandoctor@126.com

**【Abstract】 Objective** To explore the relationship between the expression of hTERT and mismatch repair gene hMSH2 in gastric cancer and the possible mechanism of carcinogenesis caused by Hp infection. **Methods** Hp infection was determined with W-S method in 93 gastric cancer and adjacent mucosa tissues. Immunohistochemistry SP method was used to examine the expression of hTERT and hMSH2 in gastric cancer and adjacent mucosa sections. **Results** The positive rate of hTERT in the gastric cancerous lesions was 79.6%, which is significantly higher than that in the neighboring normal mucosa (22.6%) ( $P < 0.01$ ). The hTERT positive rate in the Hp positive patients was higher than the Hp negative patients ( $P < 0.01$ ). The positive rate of hMSH2 in the gastric cancerous lesions was 65.6%, which is significantly higher than that in the neighboring normal mucosa (38.7%) ( $P < 0.01$ ). The hMSH2 positive

基金项目:山东青岛市科技发展基金项目(03-2-je-13)

作者单位:266021 青岛,山东青岛市市立医院消化内科(战淑慧、李宁、董全江、周容容、张明);山东青岛市肿瘤医院(郑翠玲)

通讯作者:战淑慧 Email:zhandoctor@126.com

rate in the Hp positive patients was lower than the Hp negative patients ( $P < 0.05$ ).

**Conclusions** Hp induced changes in the expression of telomerase and high expression of hMSH2 may be associated with the development of gastric cancer.

**【Key words】** Helicobacter pylori; Gastric cancer

胃癌是严重危害人类健康的主要疾病之一。自 1983 年 Wallen 和 Mashall 发现幽门螺旋杆菌(Helicobacter pylori, Hp)以来,其与胃癌发生、发展关系日益受到人们的重视,世界卫生组织(WHO)已将 Hp 列为第一类致癌因子<sup>[1]</sup>,甚至有些学者认为 Hp 感染导致原癌基因的激活、抑癌基因的失活。端粒酶活性的表达是恶性肿瘤细胞无限增殖的重要分子基础,在胃癌发生、发展中起重要作用。hMSH2 是人类错配修复(MMR)基因之一,错配修复基因突变将会出现微卫星不稳定或复制错误,使整个基因组不稳定性增加,从而引起包括癌基因和抑癌基因的一系列变化,发生肿瘤。因此,探讨 Hp 感染对端粒酶及 hMSH2 在胃癌组织中表达的影响,而进一步明确 hTERT、hMSH2 基因在胃癌发生中的作用和 Hp 致癌的可能机制。

## 资料与方法

### 一、研究对象

青岛市市立医院 2002 年 10 月至 2006 年 10 月外科行胃癌根治术治疗,临床病理资料齐全,石蜡包埋标本保存完好的 93 例胃癌病例为研究对象。取 93 例胃癌组织为实验组,其对应标本的切口边缘正常组织(距肿瘤组织至少 5 cm)为对照组。男性 57 例,女性 36 例,年龄 32 ~ 79 岁,平均( $57.2 \pm 13.7$ )岁。经病理检查确诊,高中分化腺癌 34 例,低分化腺癌 43 例,黏液癌 16 例。所有患者均为散发性胃癌,术前未经过放射治疗或化学治疗。免疫组织化学前行 HE 染色,双盲法确定肿瘤组织分化类型和此后的阳性结果判定。

将癌组织标本分为 Hp 感染组和非感染组,其中 Hp 感染组 39 例,非感染组 53 例。

### 二、Hp 的检测

采用快速尿素酶法和 Warthin-Starry 银染色法检测 Hp,两种方法均阳性者判为 Hp 感染,两种方法均阴性者判为 Hp 阴性,单项阳性者不纳入试验。

### 三、免疫组织化学

兔抗人 hTERT 多克隆抗体(美国 Santa Cruz Biotechnology, Inc.)购自武汉博士德生物工程有限公司。鼠抗人 hMSH2 单克隆抗体购自福州迈新生物技术开发公司(Maxim Biotech, Inc)。工作浓度均为 1:100。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 S-P 法检测胃癌组织 hTERT、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。

#### 四、结果判定

W-S 银染法中细胞核和 Hp 着色为棕黑色,胞浆和黏液为浅黄色。hTERT 阳性染色呈棕黄色,主要定位于细胞核,少部分细胞质也有染色,计数 500 个细胞中的阳性细胞数,hTERT 抗原表达阳性细胞数  $\geq 10\%$  判为弱阳性(+), $\geq 50\%$  判为中等阳性(2+), $\geq 75\%$  判为强阳性(3+), $< 10\%$  判为阴性(-)。hMSH2 基因蛋白以细胞核呈棕黄色颗粒为阳性表达,少数细胞出现胞浆着色。随机选择 5 个高倍视野,计数 500 个肿瘤细胞,计算染色阳性肿瘤细胞百分率以阳性细胞占癌细胞的 20% 以上为阳性。

#### 五、统计学方法

实验数据严格按照统计学要求收集、整理和建立数据库,采用 SPSS 12.0 统计软件进行处理分析。采用卡方检验或确切概率法检验, $P < 0.05$  为对比组间的差异有统计学意义。

### 结 果

#### 一、胃癌组织中 hTERT、hMSH2 蛋白的表达

hTERT 阳性信号主要位于细胞核内(图 1、2)。胃癌组织 hTERT 阳性率为 79.6% (74/93),明显高于癌旁组织 22.6% (21/93),两组阳性率有显著性差异( $\chi^2 = 60.4366, P < 0.01$ ),见表 1。分化越低其阳性表达越强。

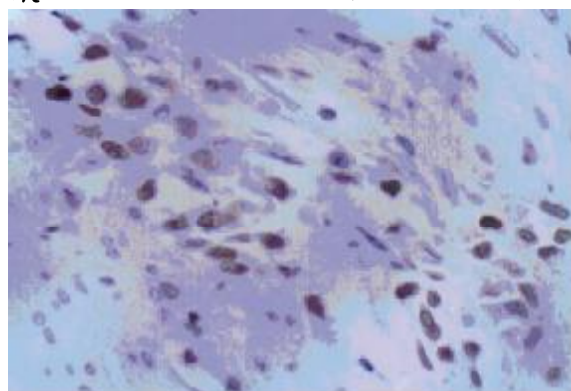


图 1 胃低分化腺癌组织内 hTERT 阳性表达  
(免疫组织化学 SP 法)  $\times 400$

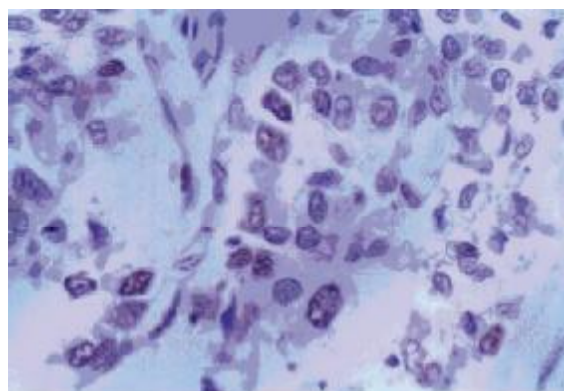


图 2 胃中分化腺癌组织内 hTERT 阳性表达  
(免疫组织化学 SP 法)  $\times 400$

hMSH2 基因蛋白表达主要位于细胞核内,部分细胞出现胞浆染色,颜色较深,偶有在间质细胞中表达(图 3、4);癌旁黏膜组织细胞核也可见阳性表达,特别是距离癌巢较近的黏膜细胞呈现较强的着色,随着距离的增加,表达强度逐渐变低。在癌组织中的阳性率显著高于癌旁组织。胃癌组织 hMSH2 阳性率为 65.6% (61/93),明显高于癌旁组织 38.7% (36/93),两组阳性率有显著性差异( $\chi^2 = 13.47, P < 0.01$ ),见表 1。

#### 二、胃癌组织中 hTERT、hMSH2 蛋白表达与临床病理特征关系

hTERT 活性表达与胃癌患者的年龄、性别、部位、大小、形态无显著相关性,

$P > 0.05$ , 胃癌组织中端粒酶的阳性表达率虽然随着肿瘤的分化程度的降低及肿瘤浸润深度的加深而增加, 但与分化程度无显著性差异, 而与浸润深度、淋巴结转移及 TNM 分期有显著相关性 ( $P < 0.01$ )。胃癌组织中 hMSH2 蛋白表达与患者性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤位置、组织学类型、浸润深度及组织分化程度无显著相关 ( $P > 0.05$ ), 与有无淋巴结转移、TNM 分期有关 ( $P < 0.01$ ), 见表 2。

### 三、Hp 感染与胃癌组织中 hTERT、hMSH2 蛋白的表达

Hp 阳性组织可见细胞核呈棕黑色, 细胞质呈黄色, 黏液内见大量短棒状略有弯曲的棕黑色 Hp。

表 1 hTERT、hMSH2 蛋白在胃癌、癌旁组织中的表达

组别	例数	hTERT			hMSH2		
		阴性(例)	阳性(例)	阳性率(%)	阴性(例)	阳性(例)	阳性率(%)
癌组织	93	19	74	79.6*	32	61	65.6*
癌旁组织	93	72	21	22.6	57	36	38.7

注: 与癌旁组织相比  $\chi^2 = 60.4366$ , \*  $P < 0.01$ ; 与癌旁组织相比  $\chi^2 = 13.47$ , \*  $P < 0.01$

表 2 hTERT、hMSH2 蛋白表达与胃癌临床病理参数的关系

临床病理参数	例数	hTERT 阳性(例)	hMSH2 阳性率(%)	阳性(例)	阳性率(%)
年龄					
<55 岁	28	23	82.1	22	78.6
≥55 岁	65	53	81.5	39	60.0
性别					
男	57	50	87.7	38	66.7
女	36	26	72.2	23	63.9
肿瘤大小					
<5 cm	35	29	82.9	23	65.7
≥5 cm	58	47	81.0	38	65.5
肿瘤位置					
贲门	19	15	78.9	12	63.2
胃体	28	21	75.0	18	64.3
胃窦	46	40	86.9	31	67.4
组织学类型					
高中分化腺癌	34	28	82.4	23	67.6
低分化腺癌	43	35	81.4	26	60.5
黏液癌	16	13	81.3	12	75.0
浸润深度					
未侵及浆膜	16	9	56.3	9	56.3
侵及浆膜	77	67	87.0*	52	67.5
淋巴结转移					
有	37	35	94.6	17	45.9
无	56	41	73.2*	44	78.6*
TNM 分期					
I、II	48	33	68.8	25	52.1
III、IV	45	43	95.6*		

注: 与相对应组相比 \*  $P < 0.01$



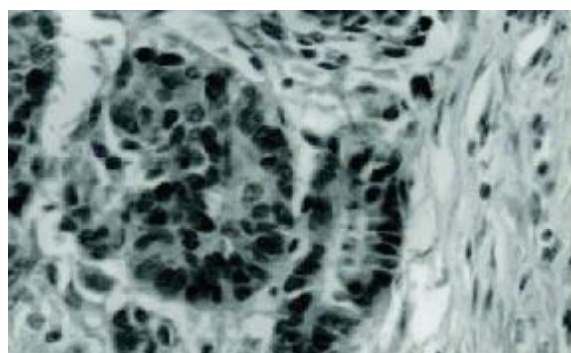


图 3 胃低分化腺癌组织内 hMSH2 阳性表达  
(免疫组织化学 SP 法) ×400

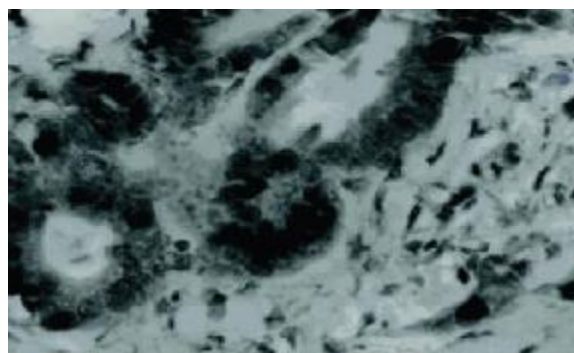


图 4 胃中分化腺癌组织内 hMSH2 阳性表达  
(免疫组织化学 SP 法) ×400

胃癌组织中, Hp 感染组 hTERT 蛋白表达阳性率高于非感染组, 2 组阳性率有显著性差别( $\chi^2 = 5.8356, P < 0.05$ ); Hp 感染组 hMSH2 蛋白表达阳性率低于非感染组, 其差异有显著性( $\chi^2 = 5.8019, P < 0.05$ ), 见表 3。

表 3 胃癌组织中幽门螺杆菌感染、hTERT 与 hMSH2 表达间的关系

Hp	例	hTERT 阳性		hMSH2 阳性	
		例	阳性率(%)	例	阳性率(%)
阳性	39	35	89.7	22	56.4
阴性	54	37	68.5*	43	79.6*

注: 与 Hp 阳性组比较  $\chi^2 = 5.8356, *P = 0.0157$ ; 与 Hp 阳性组比较  $\chi^2 = 5.8019, *P = 0.0160$

## 讨 论

胃癌的发生是一个多阶段、多因素的复杂发展过程。Hp 与胃癌、胃黏膜相关性淋巴瘤的密切关系为许多研究肯定, 并于 1994 年被列为第一类致癌因子<sup>[1]</sup>。有研究认为, Hp 感染可使胃癌发生的危险性增加 6 倍, 但 Hp 的致癌机制未明。Hp 感染是否通过影响癌基因、抑癌基因或 DNA 错配修复基因而与端粒酶的激活有关? 因此, 探讨 Hp 感染、p27 基因、hMSH2 及端粒酶在消化道肿瘤中的表达与相关性, 对于研究消化道肿瘤的发生、发展有着重要意义。本研究以此为切入点, 采用免疫组织化学技术检测了胃癌组织及对应癌旁组织中 hTERT、hMSH2 和 p27 蛋白的表达, 为进一步探讨 Hp 致癌机制奠定基础。

胃癌组织中端粒酶表达与幽门螺杆菌感染的关系。端粒酶的激活是胃癌发生多基因步骤中的关键步骤。本研究结果表明, 胃癌组织端粒酶阳性表达率为 79.6%, 癌旁组织中端粒酶阳性表达率为 22.6%, 两组阳性率有显著性差异。hTERT 活性表达与胃癌患者的年龄、性别、部位、大小、形态及分化程度无显著相关性,  $P > 0.05$ , 与浸润深度、淋巴结转移及临床分期有显著相关性。hTERT 基因的检测可作为诊断胃癌的又一指标, 对胃癌的诊治及预后判断具有一定的指导意义。

近年研究显示 Hp 感染与端粒酶激活有关。何兴祥等<sup>[2]</sup>用 *cagA*<sup>+</sup>-Hp 培养滤液与胃上皮细胞共孵育 6 h, 诱导了胃上皮细胞端粒酶活性表达上调, 撤除 Hp 培养滤液继续培养 24 h 后, 其改变得以逆转, 提示 Hp 的毒性产物显著地诱导了胃上皮细胞端粒酶表达上调。Kuniyasu 等<sup>[3]</sup>认为 Hp 感染可能是肠上皮化生组织中 hTERT 过度表达的强启动因子。我们对 93 例胃癌组织端粒酶相关基因表达的研究显示: 胃癌组织中 Hp 阳性患者 hTERT 表达率为 89.7%, 显著高于 Hp 阴性患者(68.5%,  $P < 0.05$ )。Hp 作为一个明确的致癌因素已获得公认, 在 Hp 感染-慢性胃炎-黏膜萎缩-肠化-胃癌这一发病模式中, 毫无疑问, Hp 作用于癌变的起始阶段, 起着先导作用, 但其具体致癌机制尚不清楚<sup>[4]</sup>。本研究提示 Hp 可能是胃黏膜上皮细胞端粒酶激活的机制之一, Hp 感染可能通过激活端粒酶而诱发胃癌。

胃癌组织中 hMSH2 表达与幽门螺杆菌感染的关系。错配修复(mismatch repair, MMR) 基因作为一个很重要的研究方向受到了许多研究者的重视。MMR 基因是癌基因和抑癌基因的上游调节基因, 通过修复碱基错配、小片段插入或缺失等 DNA 损伤和基因结构异常, 降低基因突变率, 维持基因组和遗传信息的稳定性。目前, 在已知的 MMR 基因中, hMLH1 和 hMSH2 与消化道肿瘤的发生密切相关<sup>[5,6]</sup>。Ma 等<sup>[7]</sup>发现胃癌组织中 hMSH2、hMLH1 和 p53 存在异常表达, Hp 感染影响上述基因的表达可能是 Hp 致癌因素之一。我们在 93 例胃癌组织中, 发现 hMSH2 基因蛋白表达阳性 61 例(65.6%), 癌旁组织中 hMSH2 表达阳性 36 例(38.7%), 两组阳性率有显著性差异。胃癌组织中 hMSH2 蛋白阳性表达率与患者性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤位置、组织学类型、浸润深度及组织分化程度无显著相关( $P > 0.05$ ), 与有无淋巴结转移、TNM 分期有关, 提示胃癌表达 hMSH2 基因蛋白的特性可能在细胞恶变时已形成, 不随细胞分化程度、生长情况而改变。

Kim 等<sup>[8]</sup>发现, 在胃黏膜培养细胞的培养液中添加 Hp 后, hMSH2 基因的表达减少, 故认为 Hp 感染能引起 hMSH2 表达下调, 本研究证实了这一结论, 发现 93 例胃癌患者中, Hp 阳性的胃癌组织中 hMSH2 表达阳性率明显低于 Hp 阴性组( $P < 0.05$ )。说明胃癌发生的危险度与 Hp 感染、hMSH2 蛋白表达之间有相关关系, 即 Hp 感染导致 hMSH2 基因蛋白修复能力下降、表达水平下降, 导致 DNA 复制过程中产生的碱基错配不能得到有效的修复, 进而造成其他基因不能正常表达, 最终导致胃癌的发生。房殿春等<sup>[9]</sup>研究表明, Hp 感染能够增强胃黏膜上皮细胞的增殖活动, 而细胞增殖活跃会增加 DNA 复制错误的机会, 而且 Hp 感染还能改变胃黏膜细胞 DNA 二级结构。在这种情况下, 如果 hMSH2 表达降低, 将不能及时有效地纠正 DNA 复制错误和碱基错配, 从而引起某些癌相关基因的突变和功能障碍, 这可能是 Hp 诱发癌变的机制之一。

综上所述, Hp 诱导的端粒酶的表达增高和 Hp 感染使错配修复基因 hMSH2 识别碱基错误的能力下降, 从而使失活的癌基因和抑癌基因得不到有效的修复, 可能是导致胃黏膜癌变的分子机制之一。

## 参 考 文 献

- 1 Ernst PB, Gold BD. The disease spectrum of *Helicobacter pylori*: the immunopathogenesis of gastroduodenal ulcer and gastric cancer. *Annu Rev Microbiol*, 2000,54:615-640.
- 2 何兴祥,胡品津,杨军,等. 不同幽门螺杆菌培养滤液对胃上皮细胞端粒酶活性的影响. *中国人兽共患病杂志*,2002,18:22-25.
- 3 Kuniyasu H, Domen T, Homamoto T, et al. Expression of human telomerase RNA is an early event of stomach carcinogenesis. *Jpn J Cancer Res*,1997,88:103-107.
- 4 胡伏莲 主编. 幽门螺杆菌感染的基础与临床. 北京:中国科学技术出版社,1997:210-215.
- 5 Park DI, Park SH, Kim SH, et al. Effect of *Helicobacter pylori* infection on the expression of DNA mismatch repair protein. *Helicobacter*,2005,10:179-184.
- 6 Hayashi T, Arai M, Ueno M, et al. Frequency of immunohistochemical loss of mismatch repair protein in double primary cancers of the colorectum and stomach in Japan. *Dis Colon Rectum*,2006,49:S23-S29.
- 7 Ma J, Fan K, Hu SW, et al. The effect of *Helicobacter pylori* infection on expression of hMSH2, hMLH1 and p53 in gastric carcinogenesis. *The Chinese-German J Clinical Oncology*,2005,4:209-212.
- 8 Kim JJ, Tao H, Carloni E, et al. *Helicobacter pylori* impairs DNA mismatch repair in gastric epithelial cells. *Gastroenterology*, 2002,123:542-553.
- 9 房殿春. 幽门螺杆菌致黏膜癌变的分子机制. *解放军医学杂志*,2003,28:966-970.

(收稿日期:2006-12-12)

(本文编辑:郭江)