

微型染色体维持蛋白 2 在大肠肿瘤中的表达及其意义

项洪刚¹, 王 强^{1*}, 何 金², 刘会敏²

(1. 第二军医大学长征医院普通外科, 上海 200003; 2. 长征医院病理科)

[摘要] **目的:**研究微型染色体维持蛋白(minichromosome maintenance proteins, MCMs)家族中的一成员 Mcm2 蛋白在大肠肿瘤中的表达情况及其意义。**方法:**采用免疫组化染色的方法, 检测了 23 例正常大肠黏膜、33 例大肠腺瘤及 69 例大肠癌组织中 Mcm2 蛋白的表达, 并以标记指数 (labelling index, LI) 量化其表达。**结果:**在正常大肠黏膜组织中, Mcm2 蛋白表达仅局限于腺体基底部的 1/3~1/2 部分的增生细胞, 而在大肠腺瘤组织和癌组织中, Mcm2 蛋白在整个上皮包括肠腔表面的细胞也有大量表达, 三者 LI 的中位数 (范围) 分别为 18% (5%~37%)、35% (15%~75%)、66% (41%~90%), 三者之间差异有显著性 ($P < 0.05$)。Mcm2 蛋白表达在大肠癌患者的不同年龄段 (≤ 40 岁和 > 40 岁)、性别、肿块大小 (≤ 3 cm 和 > 3 cm)、病理学类型、Dukes 分期之间无显著性差异 ($P > 0.05$), 但在大肠肿瘤的不同分化程度 (大肠癌的 I、II、III 级, 大肠腺瘤的轻、中、重度不典型增生) 之间有显著性差异 ($P < 0.05$), 呈逐渐升高趋势。**结论:**Mcm2 蛋白是大肠肿瘤组织的一种可靠标志物, Mcm2 的表达可以提示大肠癌的恶性程度高低和腺瘤的恶变可能性, 有助于临床判断患者的预后以及选择合适的治疗方法。

[关键词] 微型染色体维持蛋白 2; 大肠肿瘤; 癌; 腺瘤

[中图分类号] R 735.34 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)01-0087-03

Expression of Mcm2 protein in colorectal neoplasm

XIANG Hong-gang¹, WANG Qiang^{1*}, HE Jin², LIU Hui-min² (1. Department of General Surgery, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Pathology, Changzheng Hospital)

[ABSTRACT] **Objective:** To determine the expression of Mcm2 (a member of MCMs family) in colorectal neoplasm and to assess the relationship between Mcm2 expression and clinicopathological characteristics of colorectal neoplasm. **Methods:** Immunohistochemical staining was used to detect the expression of Mcm2 in normal colorectal mucosa ($n=23$), adenoma ($n=33$), and cancer ($n=69$) tissues, and the results were quantified by calculating the labelling index (LI). **Results:** Mcm2 expression in normal colorectal mucosa was confined to the 1/3-1/2 of colonic crypts basal; there was no expression in colonocytes surface. In colorectal adenoma and cancer, Mcm2 expression was seen throughout epithelium, including the colonocytes surface. The median (range) LI of Mcm2 in these 3 tissues were 18% (5%-37%), 35% (15%-75%), 66% (41%-90%), respectively. The differences between normal mucosa, adenoma and cancer were statistically significant ($P < 0.05$). There was no statistical significance between the LI of Mcm2 and some clinicopathological characteristics such as the age, sex, size, histopathology and Dukes stage. A significant association was demonstrated between Mcm2 LI and the grade of colorectal cancer and adenoma. **Conclusion:** Mcm2 may serve as a reliable and useful diagnostic marker for colorectal neoplasm and can predict the degree of differentiation in colorectal neoplasm, which may help to predict the clinical prognosis of the related patients.

[KEY WORDS] minichromosome maintenance protein 2; colorectal neoplasm; carcinoma; adenoma

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(1): 87-89]

微型染色体维持蛋白 (minichromosome maintenance proteins, MCMs) 是真核细胞 DNA 复制前复合体的组成部分, 是所有真核细胞 DNA 复制启动所必需的。它是一蛋白家族, 共有 6 个结构相关的成员, 即 Mcm2~7^[1~4]。MCMs 只存在于处于细胞增殖周期的细胞核中, 在静止期细胞或分化好的细胞中不表达或低表达, 因此它可以作为增殖细胞的特异标志。研究^[5~8]提示 MCMs 可以作为宫颈、皮肤、食管、肺、肾脏等器官肿瘤和癌前病变的细胞标记物, 但 MCMs 在大肠组织中的表达还缺乏系统研究。本实验拟通过检测 MCMs 家族成员中的

Mcm2 蛋白在大肠组织中的表达, 以了解其作为大肠癌和大肠腺瘤标记物的可能性, 并探讨其表达与大肠肿瘤临床病理特征之间的关系。

1 材料和方法

1.1 病理标本 (1) 大肠癌标本 69 例, 为本院 1997 年 1 月至 2003 年 12 月手术切除标本, 全部获

[作者简介] 项洪刚 (1976-), 男 (汉族), 硕士。

E-mail: xiang-hg@hotmail.com

* Corresponding author.

病理学确诊,且术前均未进行化学治疗和放射治疗,其中结肠癌 29 例,直肠癌 40 例;男性 33 例,女性 36 例,年龄 34~79 岁,中位年龄 57 岁。(2)大肠腺瘤标本 33 例,为本院 2000 年 1 月至 2003 年 12 月肠镜检查发现息肉行活检或切除的标本,全部获病理学确诊。(3)正常大肠黏膜 23 例,均取自新收集病例标本,包括 17 例结肠癌根治术切除标本距肿块 8 cm 以上的切缘组织及 6 例直肠癌根治术标本距肿块 5 cm 以上的切缘组织,均经病理学诊断为正常大肠黏膜。

1.2 试剂 小鼠抗 Mcm2 单克隆抗体由英国剑桥大学 Hutchison MRC 研究中心 Brown 先生惠赠。小鼠 EnVision™ 试剂盒 K4001 购自 DAKO 公司。AEC 显色试剂盒 AEC-0037 购自福州迈新生物技术公司。水性封片剂 S3025 购自 DAKO 公司。

1.3 免疫组织化学染色 石蜡包埋标本切片(4 μm),脱蜡,乙醇脱水,3%过氧化氢室温 10 min 消除内源性过氧化物酶;用 pH 6.0 的柠檬酸钠缓冲液高温高压修复抗原 6 min,加 Mcm2 单克隆抗体(1:10 稀释),4℃ 冰箱过夜;PBS 洗 3 min×3 次;加入 EnVision™,37℃ 温箱孵育 60 min;PBS 洗 3 min×3 次;AEC 显色,苏木精复染,水性封片剂封片。以正常小鼠血清代替一抗作替代对照,PBS 作空白对照。

1.4 结果判定 显微镜下观察在良好的组织结构及清晰的背景上细胞核出现红色颗粒为阳性,每一切片在低倍镜下选择组织结构良好、背景清晰的 5 个阳性细胞最密集的区域,每个区域在高倍镜视野下(×200)计算 100 个细胞中的阳性细胞数,取 5 个区域阳性细胞数的平均值作为标记指数(labeling index, LI)。

1.5 统计学处理 各组标记指数采用 Wilcoxon 秩和检验法,检验水准取 0.05,双尾检验。所有数据采用 SPSS 11.0 统计分析软件分析。

2 结果

2.1 Mcm2 蛋白在正常大肠黏膜、大肠腺瘤和大肠癌中的表达 正常大肠组织中(图 1A),Mcm2 表达仅局限于腺体基底部 1/3~1/2 部分的增生细胞,而间质细胞和靠近肠腔表面的细胞未见染色。大肠腺瘤组织中(图 1B),Mcm2 染色分布较正常组织广泛,在整个上皮包括肠腔表面细胞也有大量表达。大肠癌组织中(图 1C),Mcm2 较腺瘤表达更广泛,染色强度也明显增强。23 例大肠正常黏膜、33 例腺瘤、69 例大肠癌 Mcm2 的 LI 中位数(范围)分别为 18%(5%~37%)、35%(15%~75%)、66%(41%~90%),各组间均有显著差异($P < 0.05$)。

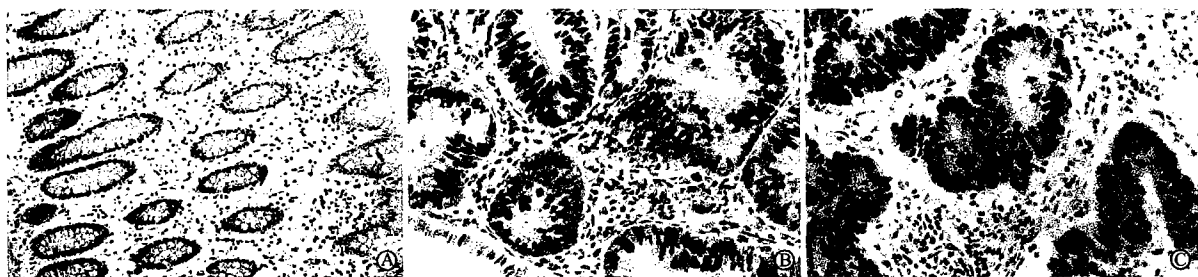


图 1 Mcm2 蛋白在大肠正常黏膜组织(A)、腺瘤组织(B)和癌组织(C)中的表达

Fig 1 Expression of Mcm2 protein in colorectal normal mucosa(A, ×100), adenoma(B, ×200) and cancer(C, ×200)

2.2 Mcm2 蛋白在大肠肿瘤中的表达与临床病理特征之间的关系 Mcm2 的 LI 在大肠癌患者不同年龄、性别、肿块大小、病理学类型(管状腺瘤、乳头状腺瘤和黏液腺瘤)、Dukes 分期(A~D 期)之间无显著性差异($P > 0.05$),但在大肠癌不同分级(I、II、III)之间均有显著性差异,且呈逐渐升高趋势(表 1)。大肠腺瘤根据其分化程度可分为轻度、中度、重度不典型增生,33 例大肠腺瘤组织中轻度不典型增生 12 例,中度不典型增生 17 例,重度不典型增生 4 例,3 种组织 Mcm2 的 LI 中位数(范围)分别为

26.5%(15%~42%)、35%(24%~50%)、54%(45%~75%),统计分析显示三者 LI 之间的差异有显著性($P < 0.05$),并呈逐渐增加趋势。

3 讨论

本实验通过 Mcm2 单克隆抗体对正常大肠黏膜组织、腺瘤组织、癌组织的免疫组化染色来研究其在这 3 种组织中的表达情况。实验结果表明, Mcm2 在正常大肠黏膜组织中有很强的规律性,主要表达在大肠腺体基底部 1/3~1/2 的细胞,这部分

表1 Mcm2 标记指数与大肠癌临床病理学特征之间的关系

Tab 1 Relationship between LI of Mcm2 and clinicopathological characteristics of colorectal cancer

Clinicopathological characteristics	n	LI median and range(%)	P value
Age(year)			0.639
≤40	9	66(41-90)	
>40	60	73(50-85)	
Sex			0.523
Male	33	66.5(41-90)	
Female	36	66(45-86)	
Size			0.139
≤3 cm	12	64(45-83)	
>3 cm	57	57(41-90)	
Histopathology			0.091
Tubular adenocarcinoma	50	65.5(41-90)	
Papillate adenocarcinoma	14	65.5(45-86)	
Mucous adenocarcinoma	5	83.5(75-85)	
Dukes stage			0.916
A	4	65(41-82)	
B	28	66(45-86)	
C	33	72(45-90)	
D	4	66(52-83)	
Grade			<0.05
I	12	56(41-76)	
II	36	65(45-83)	
III	21	83.5(64-90)	

细胞处于增殖状态,而间质细胞和靠近肠腔表层的细胞基本无表达,符合正常组织中增殖细胞的分布规律。但在大肠腺瘤和大肠癌组织中,Mcm2 的表达不存在上述规律性,表达范围和层次广泛,包括靠近肠腔表面的细胞也可见大量 Mcm2 表达阳性的细胞,同时染色强度也明显增强。3 种组织间 Mcm2 的 LI 也有很大不同,呈递增趋势,而且统计分析显示三者之间的差异均有显著意义,符合三者细胞增殖活性逐一递增的规律。

Mcm2 在大肠正常黏膜、腺瘤、癌组织中的表达差异提示 Mcm2 具有潜在的临床应用价值。因为正常大肠黏膜组织表层细胞无 Mcm2 的表达,则其脱落细胞也不应有 Mcm2 的表达,而在大肠腺瘤和大肠癌患者中,由于 Mcm2 的表达范围发生明显变化,表层细胞也有 Mcm2 的表达,因此其脱落细胞也可见 Mcm2 表达。这提示如果提取患者粪便中的脱落细胞,可以通过检测 Mcm2 的表达来鉴别正常黏膜的脱落细胞和大肠肿瘤(包括腺瘤和癌)的脱落细胞,从而筛查诊断大肠肿瘤。英国剑桥大学 Davies 等^[9]报道通过检测从粪便表面收集的脱落细胞的 Mcm2 表达可以作为一种非侵入性的结肠癌的诊断方法,阳性率达 90% 以上,无假阴性,比粪便

隐血试验有更高的检出效率。

本实验结果同时表明,Mcm2 的 LI 与大肠癌患者的年龄、性别、肿瘤大小、病理学类型、Dukes 分期等因素均无显著性相关,但 Mcm2 的 LI 与大肠癌的分级、大肠腺瘤的不典型增生分度显著相关,说明了 Mcm2 能比较准确反映组织中细胞的增殖活性,同时也提示 Mcm2 的 LI 与肿瘤的分化程度呈负相关,肿瘤细胞分化越高,阳性率越低,分化越低,阳性率越高,提示 Mcm2 有助于判断大肠癌的恶性程度和大肠腺瘤的不典型增生程度,从而指导临床治疗和判断预后等。

因此,根据本研究结果的发现,认为 Mcm2 可以作为一比较可靠的大肠肿瘤细胞的标志物,有助于对大肠肿瘤疾病的诊断,同时根据 Mcm2 的表达可以提示大肠癌的恶性程度高低和腺瘤的恶变可能性,有助于临床判断患者的预后以及选择合适的治疗方法。

[参考文献]

- [1] Kearsey SE, Labib K. MCM proteins: evolution, properties, and role in DNA replication[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1998, 1398(2): 113-136.
- [2] Tye BK. MCM proteins in DNA replication[J]. *Ann Rev Biochem*, 1999, 68: 649-686.
- [3] Ishimi Y, Komamura Y, You Z, et al. Biochemical function of mouse minichromosome maintenance protein 2[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(14): 8369-8375.
- [4] Lindner K, Gregan J, Montgomery S, et al. Essential role of MCM proteins in premeiotic DNA replication[J]. *Mol Biol Cell*, 2002, 13(2): 435-444.
- [5] Freeman A, Morris LS, Mills AD, et al. Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy[J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(8): 2121-2132.
- [6] Todorov IT, Werness BA, Wang HQ, et al. HsMCM2/BM28: a novel proliferation marker of human tumor and normal tissues[J]. *Lab Invest*, 1998, 78(1): 73-78.
- [7] Going JJ, Keith WN, Neilson L, et al. Aberrant expression of minichromosome maintenance proteins 2 and 5, and Ki-67 in dysplastic squamous oesophageal epithelium and Barrett's mucosa[J]. *Gut*, 2002, 50(3): 373-377.
- [8] Alison MR, Hunt T, Forbes SJ. Minichromosome maintenance (MCM) proteins may be pre-cancer markers[J]. *Gut*, 2002, 50(3): 290-291.
- [9] Davies RJ, Freeman A, Morris LS, et al. Analysis of minichromosome maintenance proteins as a novel method for detection of colorectal cancer in stool[J]. *Lancet*, 2002, 359(9321): 1917-1919.

[收稿日期] 2004-05-24

[修回日期] 2004-09-02

[本文编辑] 贾泽军, 邓晓群