

本文引用: 张磊, 吴慧丽, 李琨琨, 等. 微小染色体维持蛋白5在胃癌、癌前病变及正常胃黏膜组织中的表达及临床病理学意义[J]. 新乡医学院学报, 2014, 31 (3): 191-194.

【基础研究】

## 微小染色体维持蛋白5在胃癌、癌前病变及正常胃黏膜组织中的表达及临床病理学意义

张磊, 吴慧丽, 李琨琨, 肖兴国

(郑州大学附属郑州中心医院消化内一科, 河南 郑州 450000)

**摘要:** **目的** 探讨微小染色体维持蛋白5(MCM5)在胃癌、癌前病变及正常胃黏膜组织中的表达及对肿瘤生物学行为的影响。**方法** 采用免疫组织化学SP法对57例胃癌组织、32例癌前病变组织和20例正常胃黏膜组织进行MCM5表达的检测。**结果** MCM5在胃癌、癌前病变及正常胃黏膜组织中的阳性率分别为87.7%、78.1%、0.0%, 癌前病变及胃癌组织中MCM5的阳性率均显著高于正常胃黏膜组织( $P < 0.01$ ); MCM5在胃癌组织中的强阳性率高于癌前病变组织( $P < 0.01$ ); MCM5在胃癌组织表达的总阳性率与分化程度、浸润深度、淋巴结转移、TNM分期无关( $P > 0.05$ ), 但胃癌低分化组织中MCM5表达的强阳性率明显高于高、中分化组织, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** MCM5可以作为癌前病变及胃癌诊断的有效标志物。

**关键词:** 微小染色体维持蛋白5; 胃癌; 癌前病变; 免疫组织化学

**中图分类号:** R735.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2014)03-0191-04

## Expression and clinicopathological significance of minichromosome maintenance 5 in human gastric carcinoma, precancerous lesion and normal gastric mucosa tissue

ZHANG Lei, WU Hui-li, LI Kun-kun, XIAO Xing-guo

(The First Department of Digestive System, Zhengzhou Central Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450000, Henan Province, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate expression of minichromosome maintenance 5 (MCM5) in human gastric carcinoma, precancerous lesion, normal gastric mucosa and the effect of it on the oncobiology behaviour. **Methods** Immunohistochemistry streptavidin peroxidase method was used to detect the expression of MCM5 in 57 cases of gastric carcinoma, 32 cases of precancerous lesion and 20 cases of normal gastric mucosa. **Results** The positive expression rates of MCM5 in gastric cancer, precancerous lesion and normal gastric mucosa were 87.7%, 78.1% and 0.0%, respectively. The positive expression rate of MCM5 in gastric cancer and precancerous lesion was higher than that in normal gastric mucosa ( $P < 0.01$ ). The strong positive expression rate of MCM5 in gastric cancer was higher than that in precancerous lesion ( $P < 0.01$ ). The total positive expression rate of MCM5 in gastric carcinoma tissues was not correlated with cell differentiation, depth of invasion, lymph node metastases and TNM stage ( $P > 0.05$ ). However, the strong positive expression rate of MCM5 in well-moderately gastric carcinoma was less than poorly differentiated gastric carcinoma ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** MCM5 can serve as an effective marker for the diagnosis of precancerous lesion and gastric carcinoma.

**Key words:** minichromosome maintenance 5; gastric carcinoma; precancerous lesion; immunohistochemistry

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,发病率和病死率均较高,异常的细胞增殖在胃癌的形成和进展中具有重要意义。微小染色体维持蛋白(minichromosome maintenance, MCM)家族是一组与DNA复制和细胞增殖密切相关的蛋白家族<sup>[1]</sup>。有研究显示, MCM蛋白只在处于增殖活动周期的细胞内表

达,并且每个细胞周期只表达1次, MCM蛋白不表达则意味着细胞已退出细胞增殖周期,成为分化成熟的细胞或进入G<sub>0</sub>期<sup>[2-3]</sup>,提示MCM蛋白可作为增殖细胞的特殊标志物,奠定了MCM蛋白在肿瘤研究中的重要地位。MCM5是近年来发现的一种能较好地反映细胞增殖活性程度的标志物,在某些良、恶性病变鉴别上有重要意义<sup>[4-5]</sup>。本实验采用免疫组织化学技术检测MCM5在胃癌、癌前病变和正常胃黏膜组织中的表达情况,从细胞水平探讨其与胃癌发生和发展的关系。

DOI: 10.7683/xyxyxb.2014.03.008

收稿日期: 2013-11-14

作者简介: 张磊(1982-),女,河南巩义人,硕士,住院医师,主要从事消化内科临床工作。

## 1 材料与方法

**1.1 标本来源** 收集郑州大学附属郑州中心医院2010年1月至2012年7月病理标本109例,其中手术切除胃癌标本57例,内镜室活组织检查标本52例,全部经病理医师检查确诊。52例活组织检查标本中癌前病变(肠上皮化生伴或不伴低级别上皮内瘤变)32例,正常胃黏膜20例。57例胃癌手术患者年龄32~85岁,平均 $(61.4 \pm 5.3)$ 岁,其中男39例,女18例;高、中分化19例,低分化38例;有淋巴结转移41例,无淋巴结转移16例;胃癌标本按2003年国际抗癌联盟与美国肿瘤联合会联合修订的胃癌分期标准进行分期,其中 $T_1 \sim T_2$ 期14例, $T_3 \sim T_4$ 期43例;Ⅰ~Ⅱ期21例,Ⅲ~Ⅳ期36例。所有胃癌患者术前均未做放射治疗或化学治疗。

**1.2 主要试剂** MCM5为浓缩型兔抗人多克隆抗体,购自Bioworld公司,工作浓度1:75。链霉卵白素-生物素-过氧化物酶(sreptavidin peroxidase, SP)超敏试剂盒、二氨基联苯胺(3,3-diaminobenzidine, DAB)显色剂均购自福州迈新生物技术开发有限公司。

**1.3 检测方法** 免疫组织化学染色采用SP法。主要步骤:(1)石蜡切片脱蜡水化;(2)体积分数3%  $H_2O_2$  室温孵育15 min,以消除内源性过氧化物酶的活性,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)冲洗3次,每次5 min;(3)抗原修复:采用乙二胺四乙酸(pH 9.0),微波热修复15 min;(4)正常羊血清工作液封闭,37℃孵育20 min,倾去勿洗;(5)滴加一抗37℃恒温水浴箱孵育2 h, PBS冲洗3次,每次5 min,滴加生物素标记二抗,37℃孵育30 min, PBS冲洗3次,每次5 min,滴加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液,37℃孵育30 min, PBS冲洗3次,每次5 min;(6)DAB显色,自来水充分冲洗,苏木精复染,常规脱水、透明、干燥、封片。用PBS缓

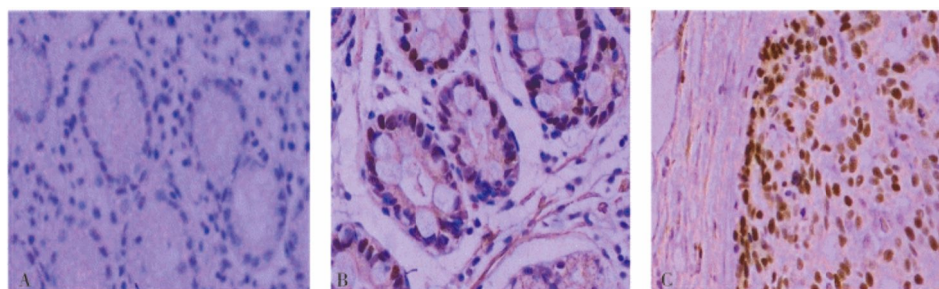
冲液代替一抗作阴性对照,用在预实验中已反复证实的阳性组织切片作阳性对照。

**1.4 结果判定** MCM5定位于细胞核,呈棕黄色或黄褐色颗粒。判断标准:在显微镜下随机选5个高倍视野( $\times 200$ ),每个高倍视野随机选100个细胞来计数阳性细胞,取平均值。无阳性染色或染色阳性细胞率 $\leq 10\%$ 为(-); $10\% <$ 阳性细胞率 $\leq 50\%$ 为(+);阳性细胞率 $> 50\%$ 为强阳性(++)。以阳性细胞率 $> 10\%$ 为阳性病例。

**1.5 统计学处理** 应用SPSS 17.0统计软件处理实验数据。采用非参数检验Kruskal-Wallis  $H$  检验对各组MCM5表达的差异进行检验;采用Spearman等级相关分析MCM5表达与病理级别间的相关性;组间率的比较采用 $\chi^2$ 检验和校正的 $\chi^2$ 检验;检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 MCM5在胃癌、癌前病变及正常胃黏膜组织中的表达** MCM5在胃组织中的阳性表达呈棕黄色,主要定位在细胞核(图1)。正常胃黏膜组织中仅在小凹上皮底部及腺颈部可见个别或小灶状细胞核阳性表达,但阳性细胞数 $\leq 10\%$ 。MCM5在胃癌、癌前病变及正常胃黏膜组织中的阳性率比较差异有统计学意义( $H = 54.407, P < 0.01$ )。胃癌及癌前病变组织中MCM5的阳性率均显著高于正常胃黏膜组织( $\chi^2 = 50.032, P < 0.01; \chi^2 = 30.093, P < 0.01$ );MCM5在胃癌组织中的总阳性率较癌前病变略高,但差异无统计学意义( $\chi^2 = 1.423, P > 0.05$ ),但MCM5在胃癌组织中的强阳性率较癌前病变组织高,差异有统计学意义( $\chi^2 = 14.248, P < 0.01$ );见表1。MCM5表达强度与病理级别的关系采用Spearman等级相关分析显示二者呈明显正相关( $r = 0.631, P < 0.01$ )。



A: 正常胃黏膜组织; B: 癌前病变组织; C: 胃癌组织。

图1 MCM5在胃癌、癌前病变及正常胃黏膜组织中的表达(SP,  $\times 200$ )

Fig.1 Expression of MCM5 in human gastric carcinoma, precancerous lesion and normal gastric mucosa (SP,  $\times 200$ )

表 1 MCM5 在胃癌、癌前病变及正常胃黏膜组织中的表达  
Tab. 1 Expression of MCM5 in human gastric carcinoma, precancerous lesion and normal gastric mucosa

组织类型	n	MCM5				总阳性率/%	强阳性率/%
		-	+	++			
胃癌组织	57	7	12	38		87.7 <sup>a</sup>	66.7 <sup>ab</sup>
癌前病变组织	32	7	17	8		78.1 <sup>a</sup>	25.0 <sup>a</sup>
正常胃黏膜组织	20	20	0	0		0.0	0.0

注:与正常胃黏膜组织比较<sup>a</sup> $P<0.01$ ;与癌前病变组织比较<sup>b</sup> $P<0.01$ 。

2.2 MCM5 表达与临床病理因素之间的关系 结果见表 2。胃癌低分化组织中 MCM5 表达的强阳性率明显高于高、中分化组织的强阳性率,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),但胃癌组织中 MCM5 表达的阳性率与患者年龄、浸润深度、分化程度、淋巴结转移及 TNM 分期均无关( $P>0.05$ )。

表 2 胃癌组织中 MCM5 表达与临床病理参数的关系  
Tab. 2 Expression and clinicopathological significance of MCM5 in human gastric carcinoma

分类	n	MCM5							
		-	+	++	总阳性率/%	P	强阳性率/%	P	
年龄									
<55	16	1	2	13	93.8	0.676	81.3	0.145	
≥55	41	6	10	25	85.4		61.0		
浸润深度									
黏膜-肌层	14	1	2	11	92.9	0.837	78.6	0.446	
浆膜及浆膜外	43	6	10	27	86.0		62.8		
分化程度									
高、中	19	4	6	9	78.9	0.318	47.4	0.029	
低	38	3	6	29	92.1		76.3		
淋巴结转移									
无	16	3	3	10	81.3	0.631	62.5	0.677	
有	41	4	9	28	90.2		68.3		
TNM 分期									
I ~ II	21	4	4	13	81.0	0.441	61.9	0.560	
III ~ IV	36	3	8	25	91.7		69.4		

3 讨论

细胞增殖与肿瘤的发生、发展过程密切相关。评价细胞的增殖状态,对研究肿瘤的生物行为、判断其危害性具有重要意义。MCM 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,在 DNA 复制起始延伸过程中发挥重要作用<sup>[6-7]</sup>。正常细胞中 MCM 蛋白的 mRNA 水平随着细胞周期的变化而改变,MCM 蛋白的表达在 G<sub>0</sub>/S 转换达峰值。当细胞进入 G<sub>0</sub> 期和分化成熟、衰老时,MCM 表达水平下降甚至不能被检测出。研究发现,处于增殖周期的细胞表达 MCM 蛋白,而已退出细胞增殖周期处于分化成熟或 G<sub>0</sub> 期的细胞则不表达 MCM 蛋白<sup>[2]</sup>。这种特点使它们成为反映细

胞增殖活性的特异性指标。

MCM5 是保守于所有真核生物的微小染色体维持蛋白家族的一员,在静止期的细胞很少表达,在正常增殖细胞和转化细胞中的含量于 G<sub>1</sub> 期开始增加,S 期早期达到高峰并与染色质结合,在 S 期至有丝分裂期呈游离状态,G<sub>2</sub> 期与 M 期时降低<sup>[8]</sup>。鉴于其具有与细胞增殖过程一致的周期性变化,被认为是一种与增殖密切相关的因子,可以作为反映细胞增殖的一项生物学标志物<sup>[4,9]</sup>。Sirieix 等<sup>[10]</sup>检测食管标本时发现,MCM5 在食管癌中呈强阳性表达,而在大多数正常食管黏膜中为阴性。Stoeber 等<sup>[11]</sup>在对生殖泌尿系肿瘤的检测中也发现在正常上皮内 MCM5 几乎不表达或者表达极弱,而在肿瘤组织中 MCM5 则有较强的表达。这提示 MCM5 能较好地反映肿瘤细胞的增殖特性,对肿瘤的诊断有一定意义。

目前,国内外将 MCM5 用于胃黏膜病变检测的仅有个别报道。本实验通过免疫组织化学 SP 法对正常胃黏膜、癌前病变、胃癌组织 MCM5 的表达进行检测,探讨其在诊断及鉴别中的意义。结果显示 MCM5 在正常胃黏膜组织中无表达或仅在小凹上皮底部及腺颈部可见个别或小灶状细胞核阳性表达,但阳性细胞数<10%。MCM5 在癌前病变及胃癌组织中高表达,阳性率分别为 78.1%、87.7%,二者差异无统计学意义,但 MCM5 在二者中的阳性表达率均显著高于正常胃黏膜组织。虽然 MCM5 在癌前病变组织与胃癌组织中的阳性表达率差异无显著性,但 MCM5 在胃癌组织中的强阳性率较癌前病变组织明显升高,这提示随着胃黏膜由正常向癌前病变和胃癌转变的过程中进入增殖周期的细胞逐渐增多,MCM5 的表达较好地反映了胃组织不同增殖阶段细胞增殖活性的变化。在临床病理工作中,胃镜活组织检查是筛查胃癌及其癌前病变的常规手段,但有时由于活组织检查组织较小,单靠形态学检查有一定的限制。本研究提示检测 MCM5 表达对于辅助诊断胃癌特别是癌前病变具有一定的价值。

本研究结果还发现胃癌低分化组织中 MCM5 表达的强阳性率明显比高、中分化组织中高,差异有统计学意义。胃癌细胞分化越高,强阳性率越低,分化越低,强阳性率越高,提示 MCM5 有助于判断胃癌的恶性程度。在胃癌组织中 MCM5 表达的阳性率与患者浸润深度、淋巴结转移及 TNM 分期均无关,提示 MCM5 的超表达是胃癌发生演进中的早期关键步骤,一旦细胞完成恶性转化,其表达则无明显变化。

综上所述,MCM5 是一种较可靠的细胞增殖标志物,能够较准确地反映细胞的增殖活性。MCM5 表达的增高不但标志着恶性细胞的增殖,而且也标志着潜在恶性细胞的增生;不但可以作为一种比较可靠的胃癌细胞的标志物,也可辅助诊断癌前病变。

#### 参考文献:

- [1] Maiorano D, Lutzmann M, Mechali M. MCM proteins and DNA replication[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2006, 18 (2): 130-136.
- [2] Schaarschmidt D, Ladenburger E M, Keller C, et al. Human MCM proteins at a replication origin during the G<sub>1</sub> to S phase transition [J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30 (19): 4176-4185.
- [3] Stoeber K, Tilley T D, Happerfield L, et al. DNA replication licensing and human cell proliferation [J]. *J Cell Sci*, 2001, 114 (Pt 11): 2027-2041.
- [4] Giaginis G, Georgiadou M, Dimakopoulou K, et al. Clinical significance of MCM2 and MCM5 expression in colon cancer: association with clinicopathological parameters and tumor proliferative capacity [J]. *Dig Dis Sci*, 2009, 54 (2): 282-291.
- [5] Steere N A, Yamaguchi S, Andrews C A, et al. Functional screen of human MCM2-7 variant alleles for disease-causing potential [J]. *Mutat Res*, 2009, 666 (1/2): 74-78.

- [6] Lei M, Tye B K. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex [J]. *J Cell Sci*, 2001, 114 (Pt 8): 1447-1454.
- [7] Labib K, Tereero J A, Difley J F. Uninterrupted MCM2-7 function required for DNA replication fork progression [J]. *Science*, 2000, 288 (5471): 1643-1647.
- [8] Snyder M, He W, Zhang J J. The DNA replication factor MCM5 is essential for Stat1-mediated transcriptional activation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102 (41): 14539-14544.
- [9] Guida T, Salvatore G, Faviana P, et al. Mitogenic effects of the up-regulation of minichromosome maintenance proteins in anaplastic thyroid carcinoma [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90 (8): 4703-4709.
- [10] Sirieix P S, Donovan M, Brown J, et al. Surface expression of minichromosome maintenance proteins provides a novel method for detecting patients at risk for developing adenocarcinoma in Barrett's esophagus [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9 (7): 2560-2566.
- [11] Stoeber K, Swinn R, Prevost A T, et al. Diagnosis of genito-urinary tract cancer by detection of minichromosome maintenance 5 protein in urine sediments [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2002, 94 (14): 1071-1079.

(本文编辑:杨 博 英文编辑:杨 博)

#### (上接第 190 页)

定价值。其次,对肿瘤治疗疗效评价有重要利用价值,特别是对抗肿瘤血管生成药物的疗效评价,是其他评价手段无法比拟的。本研究设计的针对肿瘤新生血管的靶向 MR 造影剂在体外具有良好的稳定性、靶向性及特异性,但尚需进一步实验观察其在体内的稳定性。

#### 参考文献:

- [1] Folkman J. Addressing tumor blood vessels [J]. *Nature Biotechnol*, 1997, 15 (6): 510.
- [2] Bogdanowich-Knipp S J, Chakrabarti S, Williams T D, et al. Solution stability of linear vs cyclic RGD peptides [J]. *J Pept Res*, 1999, 53 (5): 530-541.
- [3] von Wallbrunn A, Hölte C, Zühlsdorf M, et al. In vivo imaging of integrin  $\alpha_v\beta_3$  expression using fluorescence-mediated tomography [J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2007, 34 (5): 745-754.
- [4] Tsuchiya K, Nitta N, Sonoda A, et al. Histological study of the biodynamics of iron oxide nanoparticles with different diameters [J]. *Int J Nanomedicine*, 2011, 6: 1587-1594.
- [5] Burrell J S, Walker-Samuel S, Baker L C, et al. Investigating temporal fluctuations in tumor vasculature with combined carbogen and ultrasmall superparamagnetic iron oxide particle (CUSPIO) imaging [J]. *Magn Reson Med*, 2011, 66 (1): 227-234.
- [6] Wu G, Wang X, Deng G, et al. Novel peptide targeting integrin

$\alpha_v\beta_3$ -rich tumor cells by magnetic resonance imaging [J]. *J Magn Reson Imaging*, 2011, 34 (2): 395-402.

- [7] Heidemann R M, Griswold M A, Müller M, et al. Feasibilities and limitations of high field parallel MRI [J]. *Radiology*, 2004, 44 (1): 49-55.
- [8] Zhang C, Jugold M, Woenne E C, et al. Specific targeting of tumor angiogenesis by RGD-conjugated ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles using a clinical 1.5-T magnetic resonance scanner [J]. *Cancer Res*, 2007, 67 (4): 1555-1562.
- [9] Jiang T, Zhang C, Zheng X, et al. Noninvasively characterizing the different  $\alpha_v\beta_3$  expression patterns in lung cancers with RGD-USPIO using a clinical 3.0 T MR scanner [J]. *Int J Nanomedicine*, 2009, 4: 241-249.
- [10] Froehlich J M, Triantafyllou M, Fleischmann A, et al. Does quantification of USPIO uptake-related signal loss allow differentiation of benign and malignant normal-sized pelvic lymph nodes [J]. *Contrast Media Mol Imaging*, 2012, 7 (3): 346-355.
- [11] Chang M, Hsiao J K, Yao M, et al. Homologous RBC-derived vesicles as ultrasmall carriers of iron oxide for magnetic resonance imaging of stem cells [J]. *Nanotechnology*, 2010, 21 (23): 235103.
- [12] Green D A, Durand M, Gumpert N, et al. Role of magnetic resonance imaging in bladder cancer: current status and emerging techniques [J]. *BJU Int*, 2012, 110 (10): 1463-1470.
- [13] Ungersma S E, Pacheco G, Ho C, et al. Vessel imaging with viable tumor analysis for quantification of tumor angiogenesis [J]. *Magn Reson Med*, 2010, 63 (6): 1637-1647.

(本文编辑:杨 博 英文编辑:杨 博)