

• 临床检验研究论著 •

DNMT1 和 HDAC1 在上皮性卵巢癌组织中的表达及临床意义

王艳云¹, 杨秋丽², 刘丽霞³, 何秀萍^{1△}

(1. 哈尔滨医科大学附属第一临床医学院妇产科, 黑龙江哈尔滨 150000; 2. 内蒙古医科大学第三附属医院妇产科, 内蒙古包头 014010; 3. 牡丹江医学院红旗医院妇产科, 黑龙江牡丹江 157011)

摘要:目的 研究 DNA 甲基转移酶(DNMT)1 和组蛋白去乙酰化酶(HDAC)1 在正常卵巢组织、良性卵巢肿瘤组织及上皮性卵巢癌组织中的表达, 分析二者与卵巢癌组织多种临床病理参数关系及相关性。方法 运用免疫组织化学方法检测 15 例正常卵巢组织、20 例良性卵巢肿瘤组织及 30 例上皮性卵巢癌组织中 DNMT1 和 HDAC1 的表达情况。分析二者的表达与卵巢癌临床病理参数的关系, 以及 2 种蛋白在卵巢癌组织中表达的相关性。结果 上皮性卵巢癌组织中 DNMT1 和 HDAC1 的表达高于正常卵巢组织和良性卵巢肿瘤组织, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 卵巢癌组织中 DNMT1 和 HDAC1 的表达与是否绝经和病理类型无关, 而与组织学分级、临床分期有关; DNMT1 和 HDAC1 二者在卵巢癌组织中的表达呈正相关。结论 DNMT1 和 HDAC1 的高表达在卵巢癌发生、发展中有重要作用。二者具有协同作用是卵巢癌发生发展的主要原因, 可以为卵巢癌的早期筛查提供理论依据。

关键词: 甲基转移酶类; 组蛋白去乙酰化酶; 免疫组织化学; 卵巢肿瘤

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.03.010

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)03-0277-03

DNMT1 and HDAC1 expression in epithelial ovarian cancer tissue and its clinical significance

Wang Yanyun¹, Yang Qiuli², Liu Lixia³, He Xiuping^{1△}

(1. Department of Gynecology and Obstetrics, the First Clinical College of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang 150001, China; 2. Department of Gynecology and Obstetrics, the Third Clinical College of Inner Mongolia Medical University, Baotou, Inner Mongolia 014010, China; 3. Department of Gynecology and Obstetrics, the Red Flag Hospital of Mudanjiang Medical University, 157011, Heilongjiang Mudanjiang, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of DNMT1 and HDAC1 in normal ovarian tissue, benign ovarian tumor tissue and epithelial ovarian cancer tissue. **Methods** Immunohistochemical method was used to detect the DNMT1 and HDAC1 expressions in 15 normal ovarian tissues, 20 benign ovarian tumor, and 30 epithelial ovarian cancer tissue. The relationship between expression and clinic pathological parameters of ovarian cancer were analyzed. **Results** DNMT1 and HDAC1 positive expression in epithelial ovarian cancer was significantly higher than that of normal ovarian tissue and benign ovarian tumor tissues ($P < 0.05$). In ovarian cancer tissue, DNMT1 and HDAC1 expressions had no significant relationship with the presence of menopause, pathological types, and histological grade. DNMT1 and HDAC1 expression in ovarian cancer tissue were positively correlated. **Conclusion** High expression of DNMT1 and HDAC1 plays an important role in the occurrence and development of ovarian cancer.

Key words: methyltransferases; histone deacetylase; immunohistochemistry; ovarian neoplasms

卵巢癌是女性生殖器官常见的恶性肿瘤之一, 发病率仅次于子宫颈癌和子宫体癌而列居第 3 位。在各类妇科肿瘤中卵巢癌的病死率最高, 对妇女生命造成严重威胁。据统计, 全球每年新增大约 20 万卵巢癌患者, 每年有 11.5 万患者死亡。统计数据显示, 中国目前每年死于癌症的人数高达 160 万。在妇科癌症中, 卵巢癌致死的妇女占全部因癌症死亡妇女人数的 6%^[1]。卵巢癌因其在早期难以检测, 又被称为“沉默杀手”。在中国, 每年约有 1.5 万名妇女死于卵巢癌, 卵巢癌的发病率呈上升的趋势^[2]。如何提高卵巢癌患者的治疗效果和生存率, 目前唯一的措施是早诊断、早治疗。本研究应用免疫组织化学技术, 检测卵巢组织中 DNA 甲基转移酶(DNMT)1 与组蛋白去乙酰化酶(HDAC)1 的表达情况, 分析其与临床病理参数的关系及二者表达的相关性, 以探讨它们在卵巢组织发生、发展过程中的作用, 期望为卵巢癌筛查提供新的理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取哈尔滨医科大学第一临床附属医院妇产科 2010 年 7 月至 2012 年 7 月收治的卵巢相关疾病患者 65

例, 采集临床病理标本, 患者均知情并同意。经过病理诊断, 15 例为卵巢组织正常, 20 例为良性卵巢肿瘤组织, 30 为上皮性卵巢癌组织。30 例上皮性卵巢癌患者中, 浆液性囊腺癌 22 例, 黏液性囊腺癌 8 例; 根据 WHO 组织学分级标准分为: 高、中分化 11 例, 低分化 19 例; 按 FIGO 临床分期标准对标本进行分类, I 期和 II 期共 9 例, III 期和 IV 期共 21 例。

1.2 方法 采用常规免疫组织化学法(SP 法)检测 HDAC1 和 DNMT1 蛋白的表达。HDAC1 多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司)工作浓度为 1:400; DNMT1 多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司)工作浓度为 1:200。通用型二抗和 DAB 显色试剂均购自北京康为世纪生物公司。分别用已知 HDAC1 和 DNMT1 高表达组织作为阳性对照, 用 PBS 替代一抗作阴性对照。

1.3 结果判定 采用半定量方法判断结果^[3-4], DNMT1 和 HDAC1 定位于细胞核, 阳性表达为突出于背景的棕黄色和棕褐色颗粒, 且境界较清晰。观察 10 个高倍视野下的细胞数, 每个视野下各计数 100 个细胞。按阳性细胞百分比以及阳性细

胞染色强弱判断免疫组化结果。(1)按阳性细胞百分比记分,阳性细胞数小于或等于 10% 为 0 分,11%~25% 为 1 分,26%~50% 为 2 分,51%~75% 为 3 分,76%~100% 为 4 分;(2)按细胞染色强弱记分,无阳性反应细胞为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。根据以上 2 项评分的乘积判断其结果,如在同一病变中存在多个不同评分的视野,则取最大值和最小值的平均值作为免疫组化评分,≤4 分判断为低表达,≥4 分判断为高表达。

1.4 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析,计数资料以率表示,率的比较采用 χ^2 检验;相关性采用 Spearman 秩相关分析; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同卵巢组织中 DNMT1、HDAC1 高表达率的比较 卵巢癌组织中的 DNMT1 定位于细胞核或细胞质中,镜下观察为粗细不等的棕黄色颗粒,在非癌组织中表达较弱,见附图 1(结果图见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。DNMT1 蛋白在上皮性卵巢癌组织、良性卵巢肿瘤组织、正常卵巢组织中的高表达率分别为 73.3% 和 25%、13.3%。卵巢癌组织中的 HDAC1 定位于细胞核或细胞质中,镜下观察为粗细不等的棕黄色颗粒,在非癌组织中表达较弱,见附图 2(结果图见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。HDAC1 蛋白在上皮性卵巢癌组织、良性卵巢肿瘤组织、正常卵巢组织中的高表达率分别为 86.7% 和 15%、6.7%。DNMT1 在正常卵巢组织与良性卵巢肿瘤组织中高表达率的差异无统计学意义($\chi^2=1.59, P=0.21$);DNMT1 在正常卵巢组织与卵巢癌组织中高表达率的差异有统计学意义($\chi^2=16.60, P=0.00$);DNMT1 在良性卵巢肿瘤组织与卵巢癌组织中高表达率的差异有统计学意义($\chi^2=13.05, P=0.00$)。HDAC1 在正常卵巢组织与良性卵巢肿瘤组织中高表达率的差异无统计学意义($\chi^2=1.65, P=0.20$);HDAC1 在正常卵巢组织与卵巢癌组织中高表达率的差异有统计学意义($\chi^2=20.89, P=0.00$);HDAC1 在良性卵巢肿瘤组织与卵巢癌组织中高表达率的差异有统计学意义($\chi^2=19.16, P=0.00$)。

2.2 卵巢癌组织组中 DNMT1 和 HDAC1 蛋白的表达与患者临床、病理参数间的关系 组织中 DNMT1 和 HDAC1 蛋白的表达的高低与有无绝经、病理类型无关,而与组织学分级、临床分期有关,见表 1。

表 1 DNMT1 和 HDAC1 表达与患者临床、病理参数间的关系[n(%)]			
临床参数	n	DNMT1 高表达	HDAC1 高表达
有无绝经			
绝经	18	11(61.11)	15(83.33)
未绝经	12	11(91.67)	11(91.67)
病理类型			
浆液性囊腺癌	22	17(77.27)	19(86.36)
黏液性囊腺癌	8	5(62.50)	7(87.50)
组织分化程度			
高、中分化	11	4(36.36)*	7(63.64)*
低分化	19	18(94.74)	19(100.00)
临床分期			
I~II 期	9	3(33.33) Δ	5(55.56) Δ
III~IV 期	21	19(90.48)	21(100.00)

*: $P<0.05$,与低分化比较; Δ : $P<0.05$,与 III~IV 期比较。

2.3 DNMT1 和 HDAC1 蛋白表达的关系 在 30 例卵巢癌

中,DNMT1 和 HDAC1 均为高表达的有 21 例;DNMT1 高表达而 HDAC1 低表达 1 例;DNMT1 低表达而 HDAC1 高表达 5 例;二者同时低表达 3 例,见表 2。Spearman 秩相关分析显示 HDAC1 表达和 DNMT1 表达呈正相关($r_s=0.429, P=0.018$)。

表 2 DNMT1 和 HDAC1 在卵巢癌组织中表达的相关性(n)			
HDAC1	DNMT1		合计
	高表达	低表达	
高表达	21	5	26
低表达	1	3	4
合计	22	8	30

3 讨 论

卵巢上皮性癌是女性生殖器官常见的恶性肿瘤之一,女性一生中发生卵巢上皮性癌的概率为 1/70,其病死率为 50%,位于妇科肿瘤的第 1 位^[5]。由于卵巢上皮性癌多起病隐匿,无明显的早期临床症状,约 2/3 患者就诊时已为晚期。早期诊断、判断复发和预后的肿瘤标记物的缺乏阻碍了卵巢上皮性癌治疗的发展。DNA 的甲基化修饰与肿瘤发生、发展密切相关^[6-7]。DNA 的甲基化是由 DNMT 催化完成的。人类 DNMT 家族包括 DNMT1、DNMT2、DNMT3A 及 DNMT3B^[8-9]。DNMT1、DNMT3A 及 DNMT3B 在多种实体肿瘤和造血系统肿瘤中表达增高,它们协同引起某些抑癌基因 5' 端调控区胞嘧啶-鸟嘌呤(CpG)岛异常高的甲基化,并使其表达受抑制,从而导致肿瘤的发生^[10-11],并与肿瘤进展有明显关系。本研究显示,DNMT1 在卵巢癌组织、良性卵巢肿瘤组织、正常卵巢组织中高表达率分别为 73.3%、25%、13.3%,卵巢癌组织中 DNMT1 高表达率比良性卵巢肿瘤组织和正常卵巢组织高。良性卵巢肿瘤组织与正常卵巢组织中的表达差异无统计学意义。DNMT1 高表达在卵巢癌多种临床、病理参数中证明与是否绝经及病理类型无关,而与组织分化程度、临床分期有关,且低分化卵巢癌组织的高表达率高于中、高分化卵巢癌组织,III~IV 期高于 I~II 期。

组蛋白乙酰化修饰是调节基因表达的另一重要方式,在基因转录调控中起非常重要的作用并直接影响肿瘤进程。本研究显示,HDAC1 在卵巢癌组织、良性卵巢肿瘤组织、正常卵巢组织中的高表达率分别为 86.7%、15%、6.7%。HDAC1 表达和 DNMT1 表达呈正相关。HDAC1 在不同卵巢组织中高表达率,在不同临床、病理参数的患者癌组织中表达情况的比较结果均与 DNMT1 相似。

组蛋白在 HDAC 的作用下发生去乙酰化时,由于核心组蛋白富含带正电荷的碱性氨基酸,与 DNA 具有高度亲和性,导致 DNA 与核心组蛋白紧密结合,从而阻碍了基本转录单位蛋白质复合物进入启动子结合位点,抑制转录功能^[12]。启动子区 DNA 甲基化与组蛋白去乙酰化之间具有协同抑制基因转录的作用,有研究认为 DNA 甲基化是基因转录抑制程序的启动者,而乙酰化修饰是执行者^[13]。以甲基 CpG 结合蛋白 2(MeCP2)为例,启动子区 CpG 发生甲基化时,MeCP2 与甲基化的 CpG 结合后,再与 Sin3A 结合,进一步与异二聚体 Mad/Max 形成复合物,该复合物募集 HDAC,形成一个共同转录抑制因子^[14]。Chen 等^[15]认为 DNMT1 能直接与 HDAC 结合,并可确定特异性结合位点,提示 DNA 甲基化与组蛋白去乙酰

化具有协调作用。

在真核生物中, DNMT1 是维持 DNA 甲基化的关键酶, 其表达与基因印记、细胞分化和发育、肿瘤形成等密切相关, HDAC1 是乙酰化过程的关键酶。本研究中, DNMT1 和 HDAC1 在卵巢癌组织中高表达, 提示 DNMT1 和 HDAC1 表达增强是卵巢癌发生的早期事件。二者高表达率随组织异型程度的增加而逐渐增高, 具有一致的表达趋势, 说明 DNMT1 和 HDAC1 在诱导基因转录抑制、最终导致肿瘤形成的机制中具有协同作用的分子基础, 提示二者共同促进了卵巢癌的进展。针对 DNMT1 和 HDAC1 的肿瘤治疗研究证实, 二者的抑制剂能有效抑制肿瘤细胞生长, 提示 DNMT1 和 HDAC1 可能成为卵巢癌早期诊疗的新靶点^[16-17]。深入研究甲基化和去乙酰化在肿瘤形成中的机制, 将有助于克服卵巢癌诊疗的难关。

参考文献

- [1] 杨新苗. 组蛋白去乙酰化酶抑制剂与蛋白酶体抑制剂协同抑制乳腺癌细胞及分子机制研究[D]. 上海: 复旦大学, 2008.
- [2] 穆玉兰, 刘鸣, 汤春生, 等. 卵巢癌筛查研究进展[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2007, 23(10): 804-805.
- [3] 韩艳, 张美花, 金铁峰, 等. HDAC1 和 HDAC6 蛋白过表达在卵巢浆液性癌中的临床病理学意义[J]. 临床与实验病理学杂志, 2010, 26(4): 394-396, 401.
- [4] 贾妍, 邹颖刚, 陈军, 等. 组蛋白去乙酰化酶 1 在人上皮性卵巢癌组织中的表达[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(2): 256-258.
- [5] Scartozzi M, De Nictolis M, Galizia E, et al. Loss of hMLH1 expression correlates with improved survival in stage III - IV ovarian cancer patients[J]. Eur J Cancer, 2003, 39(8): 1144-1149.
- [6] Singal R, Ginder GD. DNA methylation[J]. Blood, 1999, 93(12): 4059-4070.
- [7] Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics[J]. Trends Genet, 2000, 16(4): 168-174.
- [8] Lo KW, Cheung ST, Leung SF, et al. Hypermethylation of the p16

gene in nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer Res, 1996, 56(12): 2721-2725.

- [9] Okano M, Xie S, Li E. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases[J]. Nat Genet, 1998, 19(3): 219-220.
- [10] Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, et al. The human DNA methyltransferases(DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors[J]. Nucleic Acids Res, 1999, 27(11): 2291-2298.
- [11] Mizuno S, Chijiwa T, Okamura T, et al. Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia[J]. Blood, 2001, 97(5): 1172-1179.
- [12] 林洁, 来茂德. DNA 甲基化、组蛋白去乙酰化与基因表达抑制[J]. 临床与实验病理学杂志, 2006, 22(3): 353-357.
- [13] Geiman TM, Robertson KD. Chromatin remodeling, histone modifications, and DNA methylation-how does it all fit together? [J]. J Cell Biochem, 2002, 87(2): 117-125.
- [14] Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, et al. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer[J]. Oncogene, 2001, 20(24): 3156-3165.
- [15] Chen D, Ma H, Hong H, et al. Regulation of transcription by a protein methyl transferase[J]. Science, 1999, 284(5423): 2174-2177.
- [16] Missiaglia E, Donadelli M, Palmieri M, et al. Growth delay of human pancreatic cancer cells by methylase inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine treatment is associated with activation of the interferon signalling pathway[J]. Oncogene, 2005, 24(1): 199-211.
- [17] Kouraklis G, Misiakos EP, Theocharis S. Histone deacetylase inhibitors as a potential therapeutic agent for human cancer treatment[J]. Target Oncol, 2006, 1(1): 34-41.

(收稿日期: 2013-10-08)

(上接第 276 页)

目前, 较少关于多种自身免疫性疾病与 HCV 感染关系的报道, 特别是多肌炎/皮肌炎特异性抗体与 HCV 感染相关的研究。本研究发现, HCV 感染者中可检测到多种自身免疫性疾病的特异性抗体。检测 HCV 患者血清中自身抗体水平, 有利于临床医生正确区分伴随自身免疫反应的 HCV 感染与单纯 HCV 感染, 而 ANA 阳性的 HCV 感染患者也容易被误诊为风湿性疾病或者其他自身免疫性疾病, 因此, 建议临床医生多参考关于 HCV 感染和自身抗体之间关系的研究。

参考文献

- [1] 周厚清, 董敏. 丙型肝炎患者血清自身抗体检测的临床研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(1): 131-132.
- [2] D'Amico E, Palazzi C, Cacciatore P, et al. Anti-ENA antibodies in patients with chronic hepatitis C virus infection[J]. Dig Dis Sci, 2002, 47(4): 755-759.
- [3] Ramos-Casals M, Loustaud-Ratti V, De Vita S, et al. Sjögren syndrome associated with hepatitis C virus: a multicenter analysis of 137 cases[J]. Medicine, 2005, 84(2): 81-89.
- [4] Agnello V, De Rosa FG. Extrahepatic disease manifestations of HCV infection: some current issues[J]. J Hepatol, 2004, 40(2): 341-352.

- [5] Bizzaro N, Villalta D, Giavarina D, et al. Are anti-nucleosome antibodies a better diagnostic marker than anti-dsDNA antibodies for systemic lupus erythematosus? A systematic review and a study of metanalysis[J]. Autoimmun Rev, 2012, 12(2): 97-106.
- [6] Hsu TC, Tsay GJ, Chen TY, et al. Anti-PCNA autoantibodies preferentially recognize C-terminal of PCNA in patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. Clin Exp Immunol, 2006, 144(1): 110-116.
- [7] Kee KM, Wang JH, Lee CM, et al. Chronic hepatitis C virus infection associated with dermatomyositis and hepatocellular carcinoma[J]. Chang Gung Med J, 2004, 27(11): 834-839.
- [8] Targoff IN, Reichlin M. The association between Mi-2 antibodies and dermatomyositis[J]. Arthritis Rheum, 1985, 28(7): 796-803.
- [9] Roux S, Seelig HP, Meyer O. Significance of Mi-2 autoantibodies in polymyositis and dermatomyositis[J]. J Rheumatol, 1998, 25(2): 395-396.
- [10] Toshikuni N, Torigoe R, Mitsunaga M, et al. Dermatomyositis associated with hepatocellular carcinoma in an elderly female patient with hepatitis C virus-related liver cirrhosis[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(10): 1641-1644.

(收稿日期: 2013-11-06)