

子宫内膜癌中 DNA 甲基转移酶 3B 的表达特点与临床意义

董颖^{1△*}, 周梅^{2*}, 巴晓军¹, 司婧文¹, 李文婷², 王颖¹, 李东¹, 李挺^{1△}

(1. 北京大学第一医院病理科, 北京 100034; 2. 新疆医科大学附属肿瘤医院病理科, 乌鲁木齐 830011)

[摘要] **目的:**探讨子宫内膜癌中 DNA 甲基转移酶 3B (DNA methyltransferase 3B, DNMT3B) 的表达特点、与雌激素受体 (estrogen receptor, ER) 和孕激素受体 (progesterone receptor, PR) 的相关性及意义。**方法:**免疫组织化学法检测 DNMT3B、ER、PR 在 104 例子宫内膜癌组织中的表达并与临床病理特点及预后相对照。**结果:**104 例子宫内膜癌组织中 DNMT3B 阳性率为 50%, I 型内膜癌 (内膜样癌) 中 DNMT3B 过表达率 (54.8%) 显著高于 II 型内膜癌 (30.0%, $P=0.028$), 且 I 型内膜癌中, 随肿瘤分化变差, DNMT3B 阳性率增加 (I 级、2 级、3 级分别为 43.3%、51.3%、86.7%), 差异有统计学意义 ($P=0.019$)。DNMT3B 在肌层侵犯程度重、存在脉管癌栓、淋巴结转移及分期晚的病例中过表达率更高, DNMT3B 过表达的患者组预后更差, 但差异未见统计学意义 ($P>0.05$)。I 型内膜癌 DNMT3B 与 ER、PR 表达呈负相关, ER、PR 阴性组 DNMT3B 过表达率 (78.9%、86.7%) 高于 ER、PR 阳性组 DNMT3B 过表达率 (47.7%、47.8%), 差异有统计学意义 ($P=0.016$, $P=0.006$); ER、PR 均阴性时, DNMT3B 过表达率最高 (92.9%), 差异有统计学意义 ($P=0.002$)。II 型内膜癌中 DNMT3B 与 ER、PR 表达未见相关性 ($P>0.05$)。序列分析显示, *DNMT3B* 基因启动子区有多个 ER、PR 结合位点。**结论:**内膜样癌与非内膜样癌中 DNMT3B 表达特点不同, DNMT3B 过表达有可能作为预后或预测因子而辅助病理诊断和生物学行为评估。I/II 型子宫内膜癌的甲基化特点可能不同, I 型内膜癌中 DNMT3B 过表达与 ER、PR 表达呈负相关, II 型内膜癌中 DNMT3B 表达与 ER、PR 表达关系不大。

[关键词] 子宫内膜肿瘤; DNA 甲基转移酶 3B; 甲基化; 受体, 雌激素; 受体, 孕激素

[中图分类号] R737.33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1671-167X(2016)05-0788-07

doi:10.3969/j.issn.1671-167X.2016.05.007

Characteristic and clinical significance of DNA methyltransferase 3B overexpression in endometrial carcinoma

DONG Ying^{1△*}, ZHOU Mei^{2*}, BA Xiao-jun¹, SI Jing-wen¹, LI Wen-ting², WANG Ying¹, LI Dong¹, LI Ting^{1△}

(1. Department of Pathology, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China; 2. Department of Pathology, Affiliated Canaer Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

ABSTRACT Objective: To determine the clinicopathological significance of the DNA methyltransferase 3B (DNMT3B) overexpression in endometrial carcinomas and to evaluate its correlation with hormone receptor status. **Methods:** Immunohistochemistry was performed to assess the expression of DNMT3B and hormone receptors in 104 endometrial carcinomas. **Results:** DNMT3B overexpression occurred frequently in endometrioid carcinoma (EC, 54.8%) more than in nonendometrioid carcinoma (NEC, 30.0%) with statistical significance ($P=0.028$). Furthermore, there was a trend that EC with worse clinicopathological variables and shorter survival had a higher DNMT3B expression, and the correlation between DNMT3B and tumor grade reached statistical significance ($P=0.019$). A negative correlation between DNMT3B and estrogen receptor (ER) or progesterone receptor (PR) expression was found in EC. DNMT3B overexpression occurred frequently in the ER or PR negative subgroups (78.9%, 86.7%) more than in the positive subgroups (47.7%, 47.8%) with statistical significance ($P=0.016$, $P=0.006$). In addition, the DNMT3B overexpression increased in tumors with both ER and PR negative expression (92.9%, $P=0.002$). However, no such correlation was found in NEC ($P>0.05$). Sequence analyses demonstrated multiple ER and PR binding sites in the promoter regions of *DNMT3B* gene. **Conclusion:** This study showed that the expression of DNMT3B in EC and NEC was different. DNMT3B overexpression in EC was associated with the worse clinicopathological variables and might have predictive value. The methylation status of EC and NEC maybe different. In addition, in EC, DNMT3B overexpression

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金 (201318101-2) 资助 Supported by the Natural Science Foundation of Xinjiang Uygur Autonomous Region (201318101-2)

△ Corresponding author's e-mail, dongying_999@163.com, Lixiaoting12@hotmail.com

* These authors contributed equally to this work

网络出版时间:2016-1-6 10:32:58 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4691.R.20160106.1032.020.html>

negatively correlated with ER or PR expression. In NEC, the correlation between DNMT3B and ER or PR status was not present.

KEY WORDS Endometrial neoplasms; DNA methyltransferase 3B; Methylation; Receptors, estrogen; Receptor, progesterone

子宫内膜癌是女性生殖道最常见的恶性肿瘤之一,世界范围内每年约新增病例 15 万^[1]。根据临床病理特点,子宫内膜癌可分为两型^[2]: I 型癌,雌激素依赖型,以子宫内膜样癌(endometrioid adenocarcinomas, EC)为代表,常与雌激素过度刺激有关,肿瘤分化好,预后相对良好,但仍有约 15% 的病例术后复发,各种治疗难以奏效; II 型癌,非雌激素依赖型,组织学类型为非子宫内膜样癌(nonendometrioid adenocarcinomas, NEC),以浆液性癌和透明细胞癌为代表,多见于绝经后老年女性,具有高度侵袭性,预后差。目前人们对两型内膜癌涉及的分子机制已有一些了解^[1]: EC 主要为抑癌基因 *PTEN* 失活,微卫星不稳定性, *PIK3CA*、*K-ras* 和 β -*catenin* 突变; NEC 的突出特点是 *p53* 突变及人表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, *HER-2*) 的过表达。

过去几十年中,以体细胞突变为为主的癌变理论有了许多变化,表观遗传学在肿瘤的发生、发展中的重要地位被揭示^[3-4]。哺乳动物中许多编码基因(大约 60%)的启动子区存在 CpG 岛, DNA 甲基化多发生在 CpG 岛的胞嘧啶第五位碳(C5)上,从而引起转录失活和基因表达沉默。DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)家族正是催化 DNA CpG 岛发生甲基化的重要组分^[5]。研究显示,子宫内膜癌中 *PTEN*、*ER*、*PR*、*E-cadherin*、*hMLH1*、*hMSH2* 等基因都存在异常甲基化现象,导致这些基因表达与功能的缺失^[6-9]。

目前有关 DNMT 在子宫内膜癌发生与演进中的作用与意义的研究不多,有限的资料显示 EC/NEC 中 DNMT 的表达特点截然相反^[10]: EC 中 DNMT3B 表达上调^[11], NEC 中其表达水平降低,推测与 NEC 全基因组低甲基化状态有关^[12]。同时一些研究提示,雌激素以受体依赖方式上调子宫内膜癌 DNMT3B 表达,促进肿瘤形成^[13], 另外一些研究则提示甲基化可导致激素受体失表达^[14]。鉴于 DNMT3B 和激素受体皆可在转录水平调控基因表达,并与子宫内膜癌密切相关,两者内在关系的揭示对深入阐明子宫内膜癌发生、发展的分子机制,探讨内膜癌治疗新靶点可能具有重要意义。

1 资料与方法

1.1 材料获取和判定

收集北京大学第一医院病理科 2001 年至 2012 年子宫内膜癌石蜡组织标本 104 例(84 例 EC, 20 例 NEC), 10 例正常增殖期内膜作为对照。由两位病理医师复阅切片,组织学分型参照 2014 年 WHO 女性生殖系统肿瘤病理学和遗传学分类标准^[15], 将子宫内膜癌分为两型: I 型,主要为子宫内膜样癌; II 型,组织类型为非子宫内膜样癌(图 1)。临床分期采用 2009 年国际妇产科联盟(The International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO)标准^[16]。无病生存时间定义为自手术治疗之日至末次随访或死亡或肿瘤复发之间间隔的时间。

1.2 免疫组织化学染色

将石蜡组织 4 μ m 切片,采用 Dako EnVision™ 免疫组织化学检测试剂盒,实验用试剂包括:抗体 DNMT3B(52A1018, Abcam, 1:250)、雌激素受体(estrogen receptor, ER, 1D5, Dako, Glostrup, Denmark)、孕激素受体(progesterone receptor, PR, PgR636, Carpinteria, CA, USA)。DNMT3B 蛋白在细胞核与细胞质中均可表达,每批染色均设置阴性对照(PBS 代替一抗)。染色结果评估采用免疫反应评分(immunoreactive score, IRS)系统, IRS = 染色强度(staining intensity, SI) \times 阳性细胞百分比(percentage of positive cells, PP)。根据阳性信号的强弱将染色强度分为 4 个等级:0 分 = 阴性, 1 分 = 弱阳性, 2 分 = 中度阳性, 3 分 = 强阳性;根据全片阳性细胞所占比例将阳性细胞百分比分为 5 个等级:0 = 0 ~ 1%, 1 = 2% ~ 10%, 2 = 11% ~ 33%, 3 = 34% ~ 66%, 4 > 66%。IRS 在 0 ~ 12 之间,根据以往文献报道和本课题组的经验^[17],我们将 IRS \geq 6 定义为 DNMT3B 过表达, IRS < 6 定义为 DNMT3B 表达正常。ER 和 PR 为胞核阳性,将 10% 以上的肿瘤细胞核阳性定义为阳性^[18](图 1)。

1.3 序列分析

转录因子预测分析软件采用 rVista 2.0 (<http://rvista.dcode.org>), CpG 岛分析采用 CpG island searcher (<http://cpgislands.usc.edu>)。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件包,两组间差异采用 χ^2 检验,多组间比较采用秩和检验,相关性采用 Spearman 相关分析,采用 Kaplan-Meier 进行生存分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

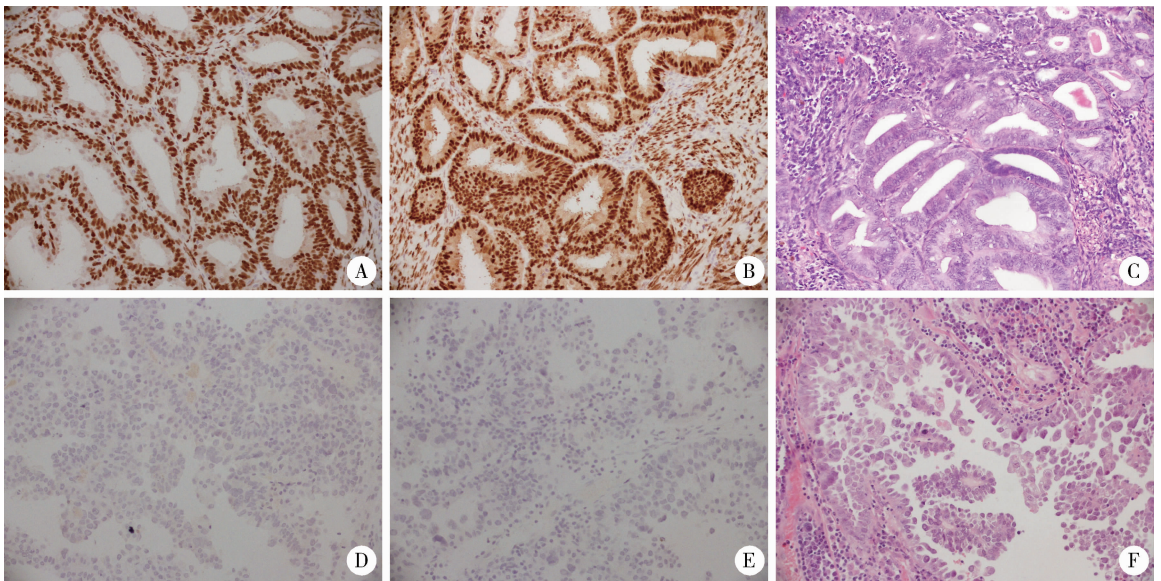
2 结果

2.1 临床病理特征

104 例子官内膜癌患者年龄 37 ~ 76 岁,中位年龄 54 岁。组织病理标本均为手术切除标本,其中 47 例同时进行了淋巴结清扫术。临床分期:85.6% (89/104) 为 I / II 期,14.4% (15/104) 为进展期 (III / IV 期)。84 例 I 型癌均为子宫内膜样癌,35.7% (30/84) 为高分化,46.4% (39/84) 为中分化,17.9% (15/84) 为低分化。所有患者的随访截止时间为 2014 年 8 月,其中 89 例获得随访资料,随访时间 6 ~ 100 个月 (平均 48 个月)。

2.2 DNMT3B 表达与内膜癌临床病理特点及预后的关系

DNMT3B 阳性信号位于细胞核和细胞质 (图 2),正常子宫内膜 DNMT3B 为阴性表达 (IRS = 0)。本组中 I 型子宫内膜癌的 DNMT3B 过表达率 (54.8%) 显著高于 II 型癌 (30.0%, $P = 0.028$),且 I 型内膜癌中秩和检验显示,随肿瘤分化变差,级别提升, DNMT3B 的过表达率增加 (1 级、2 级、3 级分别为 43.3%、51.3%、86.7%, $P = 0.019$)。Spearman 相关分析显示, DNMT3B 过表达与 I 型内膜癌的肿瘤级别呈正相关 ($r = 0.388$, $P < 0.001$),同时, I 型内膜癌中, DNMT3B 在肌层侵犯程度重、存在脉管癌栓、淋巴结转移及分期晚的病例中过表达率更高,但差异未见统计意义 (表 1)。Kaplan-Meier 生存分析也显示 DNMT3B 过表达组的无病生存期更短,但差异亦未见统计学意义。



ER, estrogen receptor; PR, progesterone receptor.

图 1 免疫组织化学染色 ER、PR 在子宫内膜样癌阳性 (A ~ C), 在浆液性癌阴性 (D ~ F) (EnVision™ × 100, HE × 100)

Figure 1 ER and PR immunohistochemistry staining and corresponding histological features of endometrioid carcinoma (positive, A, B, and C) and serous carcinoma (negative, D, E, and F) (EnVision™ × 100, HE × 100)

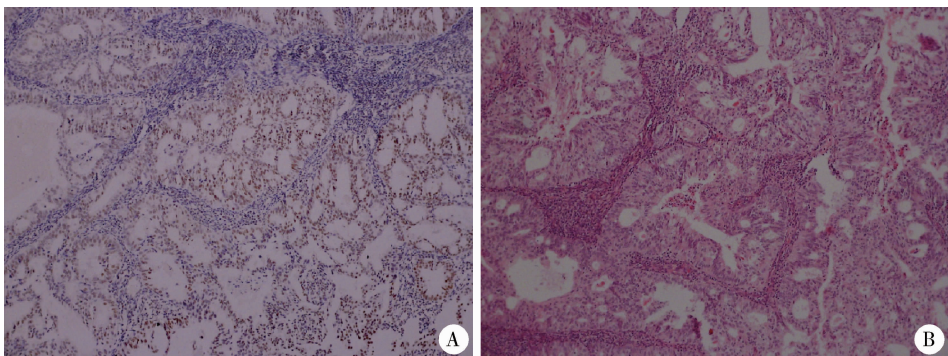


图 2 子宫内膜样癌免疫组织化学染色 DNMT3B 蛋白过表达 (A) 及相应的组织学表现 (B) (EnVision™ × 100)

Figure 2 The immunohistochemistry staining of DNMT3B overexpression (A) and corresponding histological features of endometrioid carcinoma (B) (EnVision™ × 100)

DNMT, DNA methyltransferase.

表 1 DNMT3B 在 104 例子宫内膜癌中的表达特点

Table 1 Comparison of clinicopathological features and expression of DNMT3B in 104 endometrial carcinomas

Variable	DNMT3B		P
	Normal	Overexpressed	
Type			
EC	38 (45.2%)	46 (54.8%)	0.028
NEC	14 (70.7%)	6 (30.0%)	
Grade (EC)			
1	17 (56.7%)	13 (43.3%)	0.019
2	19 (48.7%)	20 (51.3%)	
3	2 (13.3%)	13 (86.7%)	
Myometrial invasion			
<1/2	42 (55.3%)	34 (44.7%)	0.077
≥1/2	10 (35.7%)	18 (64.3%)	
Lymph node metastases ^a			
No	20 (48.8%)	21 (51.2%)	0.139
Yes	1 (16.7%)	5 (83.3%)	
Vessel invasion			
No	45 (52.3%)	41 (47.7%)	0.300
Yes	7 (38.9%)	11 (61.1%)	
FIGO stage			
I and II	45 (50.6%)	44 (49.4%)	0.780
III and IV	7 (46.7%)	8 (53.3%)	

a, 47 patients received lymphadenectomy. DNMT, DNA methyltransferase; EC, endometrioid carcinoma; NEC, nonendometrioid carcinoma; FIGO, the International Federation of Gynecology and Obstetrics.

表 2 子宫内膜样癌和非内膜样癌中 DNMT3B 表达与 ER、PR 的关系

Table 2 Associations between DNMT3B and ER or PR status in EC and NEC

Variable	DNMT3B expression					
	EC			NEC		
	Normal	Overexpressed	Total	Normal	Overexpressed	Total
ER -	4 (21.1%)	15 (78.9%)	19	10 (71.4%)	4 (28.6%)	14
ER +	34 (52.3%)	31 (47.7%)	65	4 (66.7%)	2 (33.3%)	6
Total	38 (45.2%)	46 (54.8%)	84	14 (70.0%)	6 (30.0%)	20
P	0.016			0.861		
PR -	2 (13.3%)	13 (86.7%)	15	8 (72.7%)	3 (27.3%)	11
PR +	36 (52.2%)	33 (47.8%)	69	6 (66.7%)	3 (33.3%)	9
Total	38 (45.2%)	46 (54.8%)	84	14 (70.0%)	6 (30.0%)	20
P	0.006			1.000		
ER - and PR -	1 (7.1%)	13 (92.9%)	14	5 (62.5%)	3 (37.5%)	8
ER + or PR +	37 (52.9%)	33 (47.1%)	70	9 (75.0%)	3 (25.0%)	12
P	0.002			0.803		

DNMT, DNA methyltransferase; EC, endometrioid carcinoma; NEC, nonendometrioid carcinoma; ER, estrogen receptor; PR, progesterone receptor.

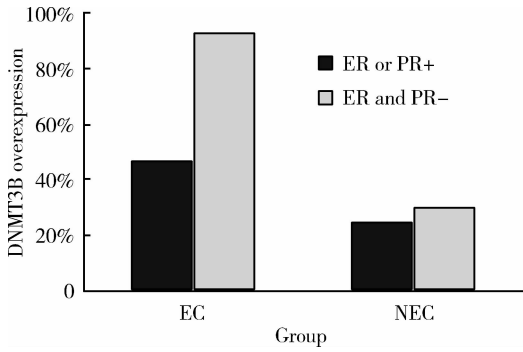
2.3 DNMT3B 与 ER、PR 表达的相关性

本组研究显示, I 型内膜癌 DNMT3B 与 ER、PR 的表达呈负相关,而在 II 型内膜癌中未见此相关性。I 型内膜癌中,ER、PR 阴性时 DNMT3B 的过表达率(78.9%、86.7%) 高于 ER、PR 阳性组 DNMT3B 的过表达率(47.7%、47.8%),同时, DNMT3B 过表达组中 ER、PR 阴性率(32.6%、28.3%) 显著高于 DNMT3B 低表达组中 ER、PR 的阴性率(10.5%、5.3%),差异有统计学意义($P=0.016$, $P=0.006$)。另外,ER、PR 两者均阴性时, DNMT3B 过表达率最高(92.9%),差异有统计学意义($P=0.002$, 表 2, 图 2)。

NEC 中 DNMT3B 与 ER、PR 的相关性不显著($P>0.05$), ER、PR 阴性组 DNMT3B 过表达率(28.6%、27.3%) 与 ER、PR 阳性组 DNMT3B 过表达率近似(33.3%、33.3%, $P=0.861$, $P=1.000$)。DNMT3B 过表达组 ER、PR 的阴性率(66.7%、50.0%) 与 DNMT3B 低表达组中 ER、PR 的阴性率近似(71.4%、57.1%, 表 2, 图 3)。

2.4 ER、PR 结合位点及甲基化预测分析

采用转录因子预测分析软件(rVista 2.0)分析 DNMT3B 基因 5'非翻译区(2 kb), 有多个 ER、PR 结合位点(图 4)。ER (*ESR1*), PR (*PGR*) 基因启动子区富于 CpG 岛(图 5)。



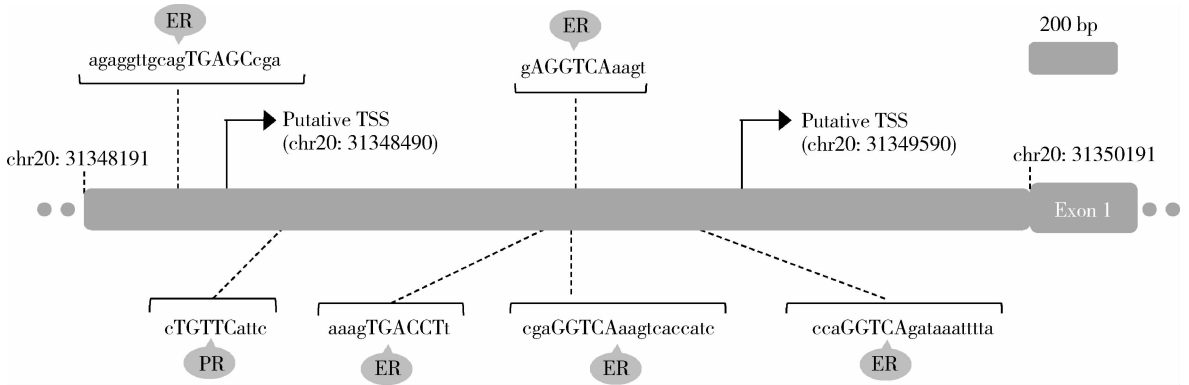
DNMT, DNA methyltransferase; EC, endometrioid carcinoma; NEC, nonendometrioid carcinoma; ER, estrogen receptor; PR, progesterone receptor.

图3 子宫内膜样癌中 DNMT3B 过表达与 ER、PR 表达呈负相关, 非内膜样癌中未见相关性

Figure 3 DNMT3B negatively correlated with ER and PR expression in EC, whereas such correlation was not present in NEC

3 讨论

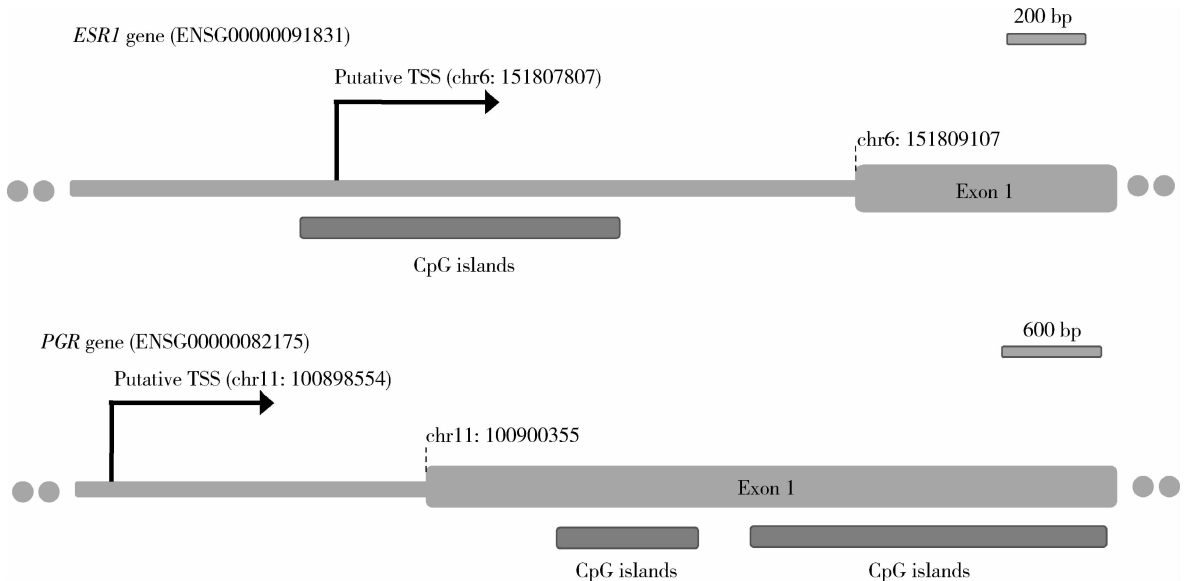
表观遗传调控是近年肿瘤研究的热点之一,反映出肿瘤发生、发展过程中各种在 DNA 序列不变情况下的基因表达调控。DNA 甲基化是表观调控的重要机制之一,甲基化异常在肿瘤发病中扮演重要角色,特别是使抑癌基因失活。DNA 甲基化多发生在基因启动子区 CpG 岛的胞嘧啶第五位碳(C5)上,即在 C5 加上一个甲基,从而引起基因转录失活和表达沉默。DNMT 家族正是催化 DNA CpG 岛发生甲基化的重要组分, DNMT 与 DNA 结合,将目标核苷酸反转暴露于 DNA 双螺旋之外,之后半胱氨酸的亲核基团从 S-腺苷甲硫氨酸处转甲基至胞嘧啶 C5 上,通过这种甲基化机制实现对基因表达的调控^[4-5]。



DNMT, DNA methyltransferase; TSS, transcription start site; ER, estrogen receptor; PR, progesterone receptor.

图4 序列分析显示 DNMT3B 基因启动子区有多个 ER、PR 结合位点

Figure 4 Schematic representation of predicted ER or PR binding sites in the promoter regions of DNMT3B gene



TSS, transcription start site.

图5 序列分析显示雌、孕激素受体基因(ESRI, PGR)上游调控区富于 CpG 岛

Figure 5 Sequence analyses demonstrated CpG rich regions upstream of ESRI and PGR genes

哺乳动物中, DNMT 蛋白家族至少有 5 个成员 (DNMT1、DNMT2、DNMT3A、DNMT3B、DNMT3L), 研究显示, 只有 DNMT1、DNMT3A 及 DNMT3B 具有甲基转移酶活性^[5]。DNMT1 在人体普遍表达, 起着维持甲基化 (maintenance methylation) 的作用, 即根据亲本链上特异的甲基化位点, 在 DNA 半保留复制的新生链相应的胞嘧啶上进行甲基化修饰。DNMT3A 和 DNMT3B 主要参与从头甲基化 (*de novo* methylation), 即在无甲基化的 DNA 双链上进行甲基化, 从头甲基化完成后就由 DNMT1 来维持其稳定的甲基化状态。DNMT3A 主要在胚胎干细胞中表达, 在成熟体细胞中表达丰度很低, 在某些特定的肿瘤 (如睾丸生殖细胞肿瘤) 中适度上调^[19]。DNMT3B 在成熟体细胞中表达丰度也很低, 但在多种肿瘤中表达上调, 被认为是肿瘤发生的早期事件^[20]。

有关子宫内 膜癌 DNMT3B 表达的研究相对有限, Xiong 等^[10]以 real-time PCR 法和 Western blot 法分析子宫内 膜癌组织 DNMT mRNA 和蛋白表达, 结果显示, EC、NEC 的 DNMT 表达特点相反, EC 中 DNMT3B、DNMT1 的表达较正常对照升高, 且分化差的肿瘤表达更高, 而在 NEC 中则显著降低, DNMT3A、DNMT2 在 EC 和 NEC 中均无明显变化。细胞系的研究结果相似, DNMT3B 在分化差的内 膜癌细胞系 (如 KLE) 中的表达显著高于分化较好的细胞系 (如 Ishikawa)^[11]。

本研究以免疫组织化学法分析 84 例内 膜样癌及 20 例浆液性癌中 DNMT3B 的表达, 结果与以往文献报道一致, 正常周期子宫内 膜中 DNMT3B 几乎全部阴性, EC 中 DNMT3B 的过表达率 (54.8%) 显著高于 NEC (30.0%), 随肿瘤分化变差, 级别提升, DNMT3B 在 EC 中的阳性率显著增加 (1 级、2 级、3 级分别为 43.3%、51.3%、86.7%); 同时, DNMT3B 在肌层侵犯程度重、存在脉管癌栓、淋巴结转移及分期晚的 EC 病例中过表达率更高, 生存分析也显示 DNMT3B 过表达组的预后更差, 但差异均未见统计学意义, 可能与我们的病例数量不够充足、随访资料有限有关。

有研究显示, I 型内 膜癌发病的重要分子事件, 如 *PTEN*、*ER*、*PR*、*E-cadherin*、*hMLH1*、*hMSH2* 等基因都存在异常甲基化现象^[6-9]。结合本组研究结果, 我们推测 DNMT3B 过表达可能通过参与这些基因甲基化, 导致其表达与功能缺失, 从而参与 I 型内 膜癌的发生、发展。II 型癌中 DNMT3B 过表达率不高, 研究显示 II 型癌全基因组 DNA 呈现一种低甲基

化状态, 从而容易发生染色体异常和基因突变^[12], DNMT3B 过表达率不高可能是导致这种现象的因素之一。

ER、PR 与内 膜癌, 特别是 I 型内 膜癌的发病密切相关, 无孕激素拮抗的雌激素过度刺激被认为是子宫内 膜增生和 I 型内 膜癌形成的重要诱导因素, 但在内 膜癌进展过程中, 激素受体丢失反而提示肿瘤侵袭性增强。当前有研究提示, 启动子甲基化是激素受体失表达的机制之一。Sasaki 等^[14]的研究发现, 子宫内 膜癌细胞系及组织中 PR 亚型 PRB 的启动子甲基化而失活, PRA 启动子未甲基化而正常表达。PRA/PRB 两者的比例很重要, Cui 等^[13]的研究认为两者比例异常可导致孕激素拮抗雌激素 (E2) 保护内 膜的作用消失, E2 可上调 Ishikawa 细胞 DNMT3B 表达, 并促进 DNA 从头甲基化活性, 此过程依赖 ER。另有研究则提示 E2 特异性上调 DNMT3B4 (非活化亚型) 表达, 降低 *CXCR4* 和 *CXCL12* 基因启动子高甲基化状态, 增加 *CXCR4* 和 *CXCL12* 表达及该通路活性, 从而促进内 膜癌细胞增殖^[21]。

本组研究结果似乎与上述文献不太一致, EC 中 DNMT3B 表达与 ER、PR 表达呈显著负相关, 且 ER、PR 同时阴性时的相关性更强, DNMT3B 过表达率高达 92.9%。虽然本文结果与以往文献看似不一致, 但从另一角度看, DNMT3B 过表达与 ER、PR 的负相关性与它们对内 膜癌生物学行为特点的提示作用相吻合, 即 ER、PR 阴性及 DNMT3B 过表达均提示内 膜癌更具侵袭性。

虽然本组数据显示 EC 中 DNMT3B 与 ER、PR 的表达呈负相关, 序列分析也显示 *ER*、*PR* 基因启动子区含有 CpG 岛, 以往文献研究也提示内 膜癌激素受体丢失与甲基化有关, 但本组数据进一步的分析显示, DNMT3B 阳性时, ER、PR 阴性率仅分别为 32.6% 和 28.3%, 提示 DNMT3B 阳性所致的启动子甲基化对 ER、PR 阴性的贡献不大, 甲基化可能不是 I 型内 膜癌 ER、PR 阴性的主要调控机制。

另外, 本组数据还显示 ER 或 PR 阴性时, DNMT3B 阳性率高达 78.9% 和 86.7%, ER/PR 同时阴性时, DNMT3B 阳性率更高 (92.9%), 较 ER、PR 阳性组的 DNMT3B 阳性率增加近 1 倍。序列分析显示, *DNMT3B* 基因上游调控区含有多个 ER、PR 结合位点, 结果提示 ER、PR 可能通过直接或间接方式负性调控 DNMT3B 表达。结合前面所述, ER、PR 阳性的内 膜癌生物学行为偏良善, 我们有理由推测 I 型内 膜癌中, ER、PR 阳性表达通过直接或间接抑制

DNMT3B 表达,降低下游一些相关抑癌基因甲基化失活,从而在肿瘤演进过程中扮演保护或拮抗的角色,而在 II 型内膜癌中, DNMT3B 过表达与 ER 或 PR 的状态关系不大。

综上所述,本研究结果提示 EC 和 NEC 中 DNMT3B 的表达特点不同,两者的甲基化特点可能不同, DNMT3B 过表达有可能作为预后或预测因子而辅助病理诊断与生物学行为评估。EC 中 DNMT3B 与 ER、PR 表达呈负相关, ER、PR 阳性可能会干扰 DNMT3B 表达,间接保护一些相关基因,特别是抑癌基因,避免其甲基化失活,但 EC 中 ER、PR 自身甲基化可能并不是导致其失表达的主要机制。

参考文献

- [1] Okuda T, Sekizawa A, Purwosunu Y, et al. Genetics of endometrial cancers [J]. *Obstet Gynecol Int*, 2010, 984013. doi: 10.1155/2010/984013.
- [2] Bokhman JV. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma [J]. *Gynecol Oncol*, 1983, 15(1): 10-17.
- [3] Jang H, Shin H. Current trends in the development and application of molecular technologies for cancer epigenetics [J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(7): 1030-1039.
- [4] Hatzimichael E, Crook T. Cancer epigenetics; new therapies and new challenges [J]. *J Drug Deliv*, 2013, 529312. doi: 10.1155/2013/529312.
- [5] Rottach A, Leonhardt H, Spada F. DNA methylation-mediated epigenetic control [J]. *J Cell Biochem*, 2009, 108(1): 43-51.
- [6] Salvesen HB, MacDonald N, Ryan A, et al. Methylation of hMLH1 in a population-based series of endometrial carcinomas [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(9): 3607-3613.
- [7] Salvesen HB, MacDonald N, Ryan A, et al. PTEN methylation is associated with advanced stage and microsatellite instability in endometrial carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2001, 91(1): 22-26.
- [8] Di Domenico M, Santoro A, Ricciardi C, et al. Epigenetic fingerprint in endometrial carcinogenesis: the hypothesis of a uterine field cancerization [J]. *Cancer Biol Ther*, 2011, 12(5): 447-457.
- [9] Banno K, Yanokura M, Susumu N, et al. Relationship of the aberrant DNA hypermethylation of cancer-related genes with carcinogenesis of endometrial cancer [J]. *Oncol Rep*, 2006, 16(6): 1189-1196.
- [10] Xiong Y, Dowdy SC, Xue A, et al. Opposite alterations of DNA methyltransferase gene expression in endometrioid and serous endometrial cancers [J]. *Gynecol Oncol*, 2005, 96(3): 601-609.
- [11] Jin F, Dowdy SC, Xiong Y, et al. Up-regulation of DNA methyltransferase 3B expression in endometrial cancers [J]. *Gynecol Oncol*, 2005, 96(2): 531-538.
- [12] Chen RZ, Pettersson U, Beard C, et al. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates [J]. *Nature*, 1998, 395(6697): 89-93.
- [13] Cui M, Wen Z, Yang Z, et al. Estrogen regulates DNA methyltransferase 3B expression in Ishikawa endometrial adenocarcinoma cells [J]. *Mol Biol Rep*, 2009, 36(8): 2201-2207.
- [14] Sasaki M, Dharia A, Oh BR, et al. Progesterone receptor B gene inactivation and CpG hypermethylation in human uterine endometrial cancer [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(1): 97-102.
- [15] Zaino R, Matias-Guiu X, Carinelli SG, et al. Epithelial tumours and precursors [M]// Kurman RJ, Carcangiu ML, Simon Herrington C, et al. WHO Classification of Tumours of Female Reproductive Organs. Lyon France: IARC Press, 2014: 125-135.
- [16] Werner HM, Trovik J, Marcickiewicz J, et al. Revision of FIGO surgical staging in 2009 for endometrial cancer validates to improve risk stratification [J]. *Gynecol Oncol*, 2012, 125(1): 103-108.
- [17] Zhang X, Dong Y, Ti H, et al. Down-regulation of miR-145 and miR-143 might be associated with DNA methyltransferase 3B overexpression and worse prognosis in endometrioid carcinomas [J]. *Hum Pathol*, 2013, 44(11): 2571-2580.
- [18] Huvila J, Talve L, Carpen O, et al. Progesterone receptor negativity is an independent risk factor for relapse in patients with early stage endometrioid endometrial adenocarcinoma [J]. *Gynecol Oncol*, 2013, 130(3): 463-469.
- [19] Loriot A, Parvizi GK, Reister S, et al. Silencing of cancer-germline genes in human preimplantation embryos; evidence for active *de novo* DNA methylation in stem cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 417(1): 187-191.
- [20] 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.
- [21] Kubarek L, Jagodzinski PP. Epigenetic up-regulation of CXCR4 and CXCL12 expression by 17 β -estradiol and tamoxifen is associated with formation of DNA methyltransferase 3B4 splice variant in Ishikawa endometrial adenocarcinoma cells [J]. *FEBS Letters*, 2007, 581(7): 1441-1448.

(2015-03-06 收稿)

(本文编辑:任英慧)