

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.05.019

PDCD4 和 DNMT1 在卵巢上皮性癌中的表达及其临床意义

杨秋丽¹ 王艳云² 刘力山¹ 刘莉霞³ 何秀萍^{1△}

(1 哈尔滨医科大学附属第一医院 黑龙江 哈尔滨 150001; 2 讷河市人民医院 妇产科 黑龙江 讷河 161300;

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:检测 PDCD4 和 DNMT1 在正常卵巢组织、卵巢良性肿瘤组织、卵巢上皮性癌组织中的表达,并探讨其临床意义。**方法:**采用免疫组化法检测 20 例正常卵巢、25 例卵巢良性肿瘤、40 例卵巢上皮性癌组织中 PDCD4 和 DNMT1 的表达情况,分析其与卵巢上皮性癌临床病理参数之间的关系。**结果:**正常及良性卵巢组织中 PDCD4 的阳性表达率明显高于卵巢癌组($P<0.05$),卵巢癌的 FIGO 分期越高,PDCD4 的表达越低,卵巢癌的病理分化程度越低,PDCD4 的表达也越低,PDCD4 的表达与卵巢癌的组织类型、腹水、年龄、是否绝经无关。正常及良性卵巢组织中 DNMT1 的阳性表达率明显低于卵巢癌组($P<0.05$),卵巢癌的病理分化程度越低,DNMT1 的表达越高,但其与卵巢癌的 FIGO 分期、组织类型、腹水、年龄、是否绝经均无关。卵巢癌中 DNMT1 的与 PDCD4 的表达呈显著负相关($P<0.05$)。**结论:**PDCD4 和 DNMT1 在卵巢癌中的表达呈负相关,PDCD4 的表达下调和 DNMT1 的表达上调可能在卵巢癌的发生及发展中起重要作用。

关键词:卵巢癌;程序性细胞死亡因子 4;DNA 甲基转移酶 1;表达

中图分类号:R737.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)05-873-05

Expression and Clinical Significance of PDCD4 and DNMT1 in Epithelial Ovarian Cancer

YANG Qiu-li¹, WANG Yan-yun², LIU Li-shan¹, LIU Li-xia³, HE Xiu-ping^{1△}

(1 The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China;

2 NeHe City People's Hospital Department of gynecology and obstetrics, Nehe, Heilongjiang, 161300, China;

3 Department of obstetrics and gynecology of Red flag hospital of Mudanjiang medical school, Mudanjiang, Heilongjiang, 157011, China)

ABSTRACT Objective: To detect the expression of PDCD4 and DNMT1 in normal ovarian tissues, epithelial benign ovarian tumor tissues and ovarian epithelial carcinoma tissues, and investigate the clinical significance of PDCD4 and DNMT1 in ovarian epithelial carcinoma. **Methods:** The expressions of PDCD4 and DNMT1 in 20 cases of normal ovarian tissues, 25 cases of epithelial benign ovarian tumor tissues, 40 cases of ovarian epithelial carcinoma tissues were detected by immunohistochemical method. Their relationship with the clinical pathological parameters of ovarian epithelial carcinoma were analyzed. **Results:** the positive expression rate of PDCD4 in normal and benign ovarian tissues were significantly higher than that in the ovarian cancer group ($P<0.05$). The higher FIGO stage of ovarian cancer was, the lower PDCD4 expression was; the lower pathological differentiation of ovarian cancer was, the lower PDCD4 expression was. The PDCD4 expression was unrelated to the tissue types of ovarian cancer, ascites, age, whether menopause or not. The positive expression rate of DNMT1 in normal and benign ovarian tissues were significantly higher than that in the ovarian cancer group ($P<0.05$). The lower pathological differentiation of ovarian cancer was, the higher DNMT1 expression was, but it was unrelated to the tissue types of ovarian cancer, ascites, age, whether menopause or not. The expression of DNMT1 and PDCD4 in ovarian cancer were significantly negative correlated ($P<0.05$). **Conclusion:** The expression of DNMT1 and PDCD4 in Ovarian cancer was negative correlation. PDCD4 downregulation and DNMT1 upregulation may play an important role in the occurrence and development of ovarian cancer.

Key words: Ovarian Carcinoma; Programmed cell death 4; DNA methyltransferase 1; Expression

Chinese Library Classification(CLC): R737.31 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)05-873-05

前言

作者简介:杨秋丽(1980-),女,硕士研究生,研究方向:妇科肿瘤临床研究, E-mail: daerduoma@126.com

△通讯作者:何秀萍,硕士生导师, E-mail: xiuping_he@live.cn

(收稿日期:2013-07-24 接受日期:2013-08-19)

肿瘤的发生、发展是一个多基因、多步骤的过程,受细胞内多个肿瘤相关因子的调控,包括抑癌基因失活和癌因子的过表达等。程序性细胞死亡因子 4(programmed cell death 4, PDCD4)是一个新近发现的与细胞凋亡相关抑癌基因^[1],其不仅对肿瘤细胞的凋亡有重要的调节作用,而且通过抑制肿瘤细胞蛋白转录和翻译过程抑制肿瘤增殖^[2]。大量的研究表明,PDCD4 在肿

瘤组织中的低表达状态对肿瘤的病理分级及预后判断有重要指导意义^[3-5]。

肿瘤发生过程中,常有甲基化紊乱而致基因表达失控。DNA 甲基化是常见的表观遗传学现象,DNA 甲基化状态的改变可以通过调节转录水平从而影响基因的表达^[6]。这种表观遗传修饰的变化能够导致抑癌基因的失活和原癌基因的激活,从而诱发肿瘤。DNA 甲基转移酶(DNA methyltransferase, DNMT)具有胞嘧啶甲基转移活性,可通过调节细胞内甲基化过程而参与肿瘤的发生与发展^[7]。DNA 甲基化反应主要由 DNA 甲基转移酶(DNMT)完成,其主要有 3 种亚型 DNMT1、DNMT3A、DNMT3B^[8]。DNMT 广泛存在于各种生物体内,与多种肿瘤的发生、发展有关^[9,10]。目前,有关 PDCD4 和 DNMT1 在卵巢癌中的表达及两者的相关性目前鲜见报道。本实验采用免疫组化法检测二者在卵巢上皮性癌组织中的表达,并分析二者的相互关系,从而探讨二者在卵巢癌发生、发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 标本资料 选取哈尔滨医科大学附属第一临床医院 2009 年至 2012 年经手术切除确诊的卵巢上皮性癌 40 例,按组织类型分为浆液性囊腺瘤 30 例、粘液性囊腺瘤 6 例、其他类型 4 例;按 FIGO 分期 I + II 20 例、III+IV 20 例;按病理分化程度高分化 9 例、中 - 低分化 31 例;按年龄分为 < 50 岁 16 例、≥ 50 岁 24 例;无腹水 16 例、有腹水 24 例;绝经前 15 例、绝经后 25 例。术前所有患者均未行化疗及放疗。取卵巢良性肿瘤 25 例,其中浆液性囊腺瘤 15 例、粘液性囊腺瘤 10 例;同时取正常卵巢组织 20 例。

1.1.2 主要试剂 兔抗人 PDCD4 抗体及兔抗人 DNMT1 抗体均购于北京博奥森生物技术有限公司,PV-6001 试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫组化染色 采用免疫组化非生物素二步法。染色步骤按照试剂盒说明书进行。

1.2.2 免疫组化结果判断 由两名病理科医生双盲下在显微镜下观察每张组织切片的显色反应,以胞浆或胞核出现棕黄色或棕褐色颗粒为阳性细胞。每张切片计数 10 个视野,每个视野各计数 100 个细胞,取阳性细胞数百分比的平均值。PDCD4 阳性信号定位于胞浆或胞核,细胞不显色或阳性细胞 < 30% 为阴性(-)、阳性细胞 ≥ 30% 为阳性(+). DNMT1 阳性信号定位于胞浆或胞核,细胞不显色或阳性细胞 < 25% 为阴性(-)、阳性细胞 ≥ 25% 为阳性(+).

1.3 统计学方法

应用统计软件 SPSS19.0 进行统计分析,计数资料的比较应用卡方检验;两变量相关性分析选择 spearman 相关性分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组卵巢组织中 PDCD4 和 DNMT1 的表达

正常卵巢组织、卵巢良性肿瘤组织、卵巢上皮性癌组织中 PDCD4 的阳性表达率分别为 85% (17/20)、76% (19/25)、35%

(14/40)。PDCD4 在正常卵巢组织及卵巢良性肿瘤组织中的表达水平均显著高于卵巢上皮性癌组织,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);而 PDCD4 在正常卵巢组织与卵巢良性肿瘤组织中的表达水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (见图 1、2)。

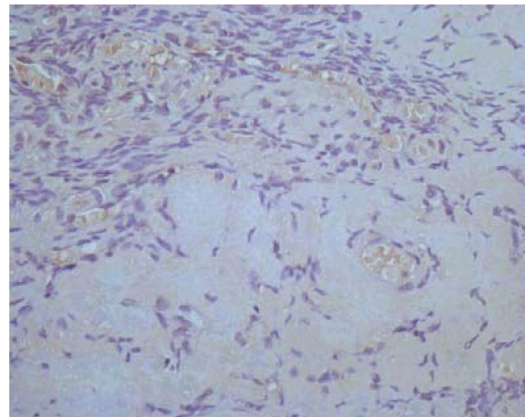


图 1 PDCD4 在正常卵巢组织中的表达 (× 400)

Fig.1 The expression of PDCD4 in normal ovarian tissue (× 400)

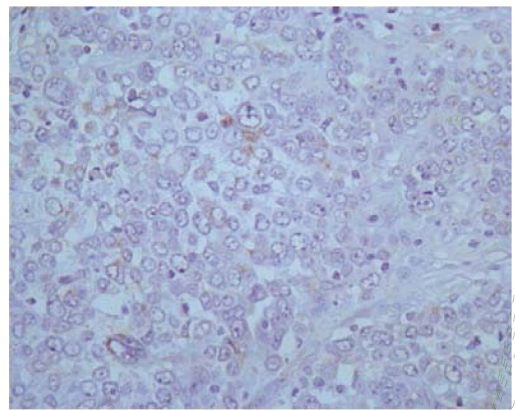


图 2 PDCD4 在卵巢癌组织中的表达 (× 400)

Fig.2 The expression of PDCD4 in ovarian cancer tissue (× 400)

正常卵巢组织、卵巢良性肿瘤组织、卵巢上皮性癌组织中 DNMT1 的阳性表达率分别为 35% (7/20)、44% (11/25)、72.5% (29/40)。DNMT1 在正常卵巢组织及卵巢良性肿瘤组织中的表达水平均显著低于卵巢上皮性癌组织,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);而 DNMT1 在正常卵巢组织与卵巢良性肿瘤组织中的表达水平比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (见图 3、4)。

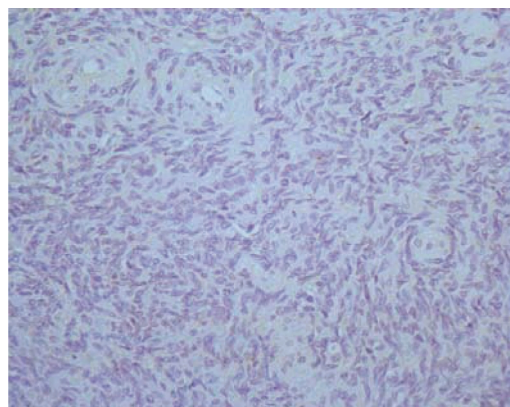
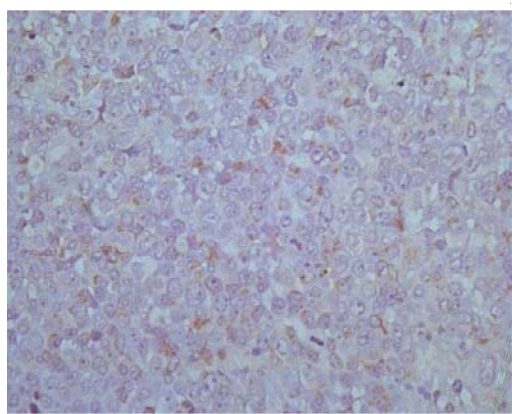


图 3 DNMT1 在正常卵巢组织中的表达 (× 400)

Fig.3 The expression of DNMT1 in normal ovarian tissue (× 400)

图 4 DNMT1 在卵巢癌组织中的表达($\times 400$)Fig.4 The expression of DNMT1 in ovarian cancer tissue ($\times 400$)

2.2 PDCD4 和 DNMT1 的表达与卵巢上皮性癌临床病理参数之间的关系

PDCD4 在卵巢上皮性癌中的阳性表达率随着 FIGO 分期的进展而降低,在 I + II 期和 III+IV 期的阳性表达率分别是 50%(10/20)、20%(4/20),两者比较差异有统计学意义($P < 0.05$);PDCD4 随着病理分化程度的降低而降低,在高分化、中-低分化中的阳性表达率分别是 66.67%(6/9)、25.81%(8/31),两者比较差异有统计学意义($P < 0.05$);PDCD4 的表达与组织学类型、有无腹水、年龄、是否绝经无显著相关性($P > 0.05$)(见表 1)。

DNMT1 在卵巢上皮性癌中的阳性表达率随着病理分化程度的降低而升高,在高分化、中-低分化中的阳性表达率分别是 44.44%(4/9)、80.65%(25/31),两者比较差异有统计学意义

表 1 PDCD4 的表达与卵巢上皮性癌临床病理参数之间的关系

Table 1 The relationship between PDCD4 expression and the clinical pathological parameters of ovarian epithelial carcinoma

Clinicopathological parameters	Number	DNMT1 protein expression		X ² value	P value
		Positive (%)	Negative (%)		
Histological type					
Serous	30	11(36.67)	19(63.33)	0.22	0.896
Mucinous	6	2(33.33)	4(66.67)		
Other	4	1(25)	3(75)		
FIGO stage					
I+II	20	10(50)	10(50)	3.956	0.047
III+IV	20	4(20)	16(80)		
Pathological differentiation					
Well differentiated	9	6(66.67)	3(33.33)	5.119	0.024
In-poorly differentiated	31	8(25.81)	23(74.19)		
Ascites					
No	16	7(43.75)	9(56.25)	0.897	0.343
Have	24	7(29.17)	17(70.83)		
Age(years)					
< 50	16	5(31.25)	11(68.75)	0.165	0.685
≥ 50	24	9(37.5)	15(62.5)		
Whether menopause					
Premenopausal	15	6(40)	9(60)	0.264	0.608
Postmenopausal	25	8(32)	17(68)		

($P < 0.05$);DNMT1 的表达与 FIGO 分期、组织学类型、有无腹水、年龄、是否绝经无显著相关性($P > 0.05$)(见表 2)。

2.3 PDCD4 和 DNMT1 表达的相关性

40 例卵巢上皮性癌中 29 例 DNMT1 呈阳性表达,其中 9 例 PDCD4 表达阳性、20 例表达阴性;11 例 DNMT1 呈阴性表达,其中 5 例 PDCD4 表达阳性、6 例表达阴性。两者之间存在负相关,差异有统计学意义($P < 0.05$)(见表 3)。

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,其死亡率为 50%,位于妇科肿瘤的首位^[1],严重危害女性的健康。该肿瘤具有起病隐匿、缺乏早期诊断、容易侵袭及远处转移、预后较差等特点。尽管化疗患者中以紫杉醇类及铂类作为基础化疗相关的客观反应率几乎达到 70%,但是严重卵巢癌患者大部分复发,最终因化疗耐药而死亡^[2]。随着分子生物学技术的发展,人们对肿瘤的发生、发展、凋亡过程从分子水平和基因水平上有了更进一步的认识,尤其是一些抑癌基因的发现和深入研究,给肿瘤的治疗提供了新的思路 and 方向,成为肿瘤治疗的新

表 2 DNMT1 的表达与卵巢上皮性癌临床病理参数之间的关系

Table 2 The relationship between DNMT1 expression and the clinical pathological parameters of ovarian epithelial carcinoma

Clinicopathological parameters	Number	DNMT1 protein expression		X ² value	P value
		Positive (%)	Negative (%)		
Histological type					
Serous	30	24(80)	6(20)	3.386	0.184
Mucinous	6	3(50)	3(50)		
Other	4	2(50)	2(50)		
FIGO stage					
I+II	20	13(65)	7(35)	1.129	0.288
III+IV	20	16(80)	4(20)		
Pathological differentiation					
Well differentiated	9	4(44.44)	5(55.56)	4.585	0.032
In-poorly differentiated	31	25(80.65)	6(19.35)		
Ascites					
No	16	14(87.5)	2(12.5)	3.009	0.083
Have	24	15(62.5)	9(37.5)		
Age(years)					
< 50	16	13(81.25)	3(18.75)	1.024	0.312
≥ 50	24	16(66.67)	8(33.33)		
Whether menopause					
Premenopausal	15	11(73.33)	4(26.67)	0.008	0.927
Postmenopausal	25	18(72)	7(28)		

表 3 PDCD4 的表达和 DNMT1 的表达在卵巢上皮性癌中的关系

Table 3 The Correlation of the expression of PDCD4 with DNMT1 in epithelial ovarian cancer PDCD4 protein expression

		Positive	Negative	Number
DNMT1 protein expression	Positive	9	20	29
	Negative	5	6	11
	Number	14	26	40
r value		-0.658		
P value		0.000		

靶点。

PDCD4 是 1995 年 Shibahara 等在小鼠体内发现的与细胞凋亡有关的基因,随后又先后在大鼠及人类中发现该基因的存在。已知人的 PDCD4 基因定位于 10q24,cDNA 全长约为 3.5kb,其中编码区约为 1.4kb、编码 185 个氨基酸。由于 PDCD4 表达增加最初见于凋亡细胞,所以有人推测其与凋亡有关。正常情况下,PDCD4 定位于细胞核内,当肿瘤发生时 PDCD4 蛋白由细胞核转移到细胞质并发挥抑制肿瘤的作用^[13]。PDCD4 可促进肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤细胞增生及侵袭。近几年来 PDCD4 在抑制肿瘤细胞的生长转化方面引起了人们越来越多的关注。有研究表明,在胃癌、大肠癌、食管癌中可检测到 PDCD4 表达下调甚至缺失,并且 PDCD4 表达的下调甚至缺失与肿瘤的进展和患者的预后密切相关^[14-16]。DNA 甲基化是通过

甲基转移酶催化完成的,在多种肿瘤细胞中 DNA 甲基转移酶表达增高,同时伴随着一些抑癌基因的低表达,如 Rb 基因、p53 基因、PTEN 基因的下降或缺失。DNMT1 是 DNA 甲基转移酶主要成员之一,在很多肿瘤细胞中呈高表达,是肿瘤细胞的特征变化之一。随着人类表观基因组计划的提出和实施,DNMT1 的作用也引来越来越多的学者重视。

本研究通过免疫组化检测 PDCD4 和 DNMT1 在卵巢组织中的表达,发现:(1)PDCD4 在正常卵巢组织、良性卵巢肿瘤组织、卵巢癌组织中均有不同程度的表达,与正常卵巢及卵巢良性肿瘤组织相比,卵巢癌组织中 PDCD4 呈低表达或缺失,且随卵巢癌 FIGO 分期的增加及分化程度的降低而逐渐降低,提示 PDCD4 可能参与了卵巢癌的分化、侵袭及远处转移,其表达下降与卵巢癌的发生、发展有关。(2)卵巢癌组织中 DNMT1 的阳

性表达率明显高于正常卵巢及卵巢良性肿瘤组织,且卵巢癌的分化程度越低,其表达越高,可能是 DNMT1 的表达上调使卵巢癌的 DNA 甲基化修饰率大大提高,导致抑癌基因失活,可能是卵巢癌细胞转化过程中的特有事件,参与卵巢癌的发生与发展;但未发现 DNMT1 的蛋白表达与卵巢癌的 FIGO 分期有明显关系,说明卵巢癌的临床分期与 DNMT1 无关,也不排除本组样本量有限未能得出阳性结果。(3)卵巢癌中 PDCD4 蛋白和 DNMT1 蛋白的表达呈显著负相关。有研究表明 PDCD4 在启动子区域有多个 CpG 岛,从表观遗传学调控机制来说, DNMT1 可以使 DNA 甲基化,可以影响 PDCD4 基因表达。在肝癌细胞中敲除 DNMT1 导致 DNA 去甲基化,从而诱导 PDCD4 的表达升高^[7]。另外,在转录水平研究中 Gao 等^[8]发现人神经胶质瘤中 PDCD4 表达下调甚至缺失,证实其主要原因是 PDCD4 5'端 CpG 岛甲基化,甲基化导致 PDCD4 转录无法进行,从而下调了 PDCD4 的表达。戴兵等^[9]把培养的肝癌细胞株 SMMC7721 用甲基化酶抑制剂 5-aza-CdR 抑制 DNMT1 的表达,发现 PDCD4 mRNA、蛋白在 DNMT1 被抑制后明显升高。这就表明作为一种重要的甲基化转移酶, DNMT1 可以影响 PDCD4 的表达。DNMT1 可能通过甲基化途径导致 PDCD4 表达下降或是失活,从而诱发卵巢肿瘤发生和发展。

因此,我们设想使用 DNA 甲基转移酶抑制剂抑制 DNMT1 在卵巢癌中的表达,提高 PDCD4 表达,能够抑制卵巢癌的发生、发展,促进卵巢癌细胞的凋亡,对卵巢癌患者实行 PDCD4 靶基因治疗,有可能弥补卵巢癌手术和放化疗的不足,提高患者生存率。随着不断的深入研究, PDCD4 可能成为肿瘤治疗的新靶点,具有广阔的应用前景。

参考文献(References)

- [1] Lankat-Buttgereit B, Goke R. Programmed cell death protein 4(pcd4): a novel target for antineoplastic therapy? [J]. *Biol Cell*, 2003, 95(8): 515-519
- [2] Lankat-Buttgereit B, Goke R. The tumour suppressor Pcd4: recent advances in the elucidation of function and regulation [J]. *Biol Cell*, 2009, 101:309-317
- [3] Chen Y, Knosel T, Kristiansen G, et al. Loss of PDCD4 expression in human lung cancer correlates with tumor progression and prognosis [J]. *J Pathol*, 2003, 200(5):640-646
- [4] Wang X, Wei Z, Gao F, et al. Expression and prognostic significance of PDCD4 in human epithelial ovarian carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2008, 18(5 B):2991-2996
- [5] Fang W, Li X, Jiang Q, et al. Transcriptional patterns, biomarkers and pathways characterizing nasopharyngeal carcinoma of Southern China [J]. *J Transl Med*, 2008, 6: 32-38
- [6] Mueller WC, von DA. Gene regulation by methylation [J]. *Recent Results Cancer Res*, 2009, 171:217-239
- [7] Chen C, Yin N, Yin B, et al. DNA methylation in thoracic neoplasms. *Cancer Lett*, 2011, 301(1):7-16
- [8] Jiang Y, Langley B, Lubin FD, et al. Epigenetics in the nervous system. *J Neurosci*, 2008, 28(46):11753-11759
- [9] Chan E C, Lam S Y, Tsang K W, et al. Aberrant promoter methylation in Chinese patients with non-small cell lung cancer: patterns in primary tumors and potential diagnostic application in bronchoalveolar lavage [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8 (12): 3741-3746
- [10] Xing R H, Rabbani S A. Transcriptional regulation of urokinase (uPA) gene expression in breast cancer cells: role of DNA methylation [J]. *Int J Cancer*, 1999, 81(3): 443-450
- [11] Scartozzi M, De Nicolis M, Galizia E, et al. Loss of h MLH1 expression correlates with improved survival in stage III-IV ovarian cancer patients. *Eur J Cancer*, 2003, 39:1144-1149
- [12] Ramirez PT, Deavers M, Gershenson D M. Efficacy of letrozole in the treatment of recurrent platinum-and taxane-resistant high-grade cancer of the ovary or peritoneum [J]. *Gynecologic Oncology*, 2008, 110(1):56-59
- [13] Bohm M, Sawicka K, Siebrasse JP, et al. The transformation suppressor protein Pcd4 shuttles between nucleus and cytoplasm and binds RNA. *Oncogene*, 2003, 22(31): 4905-4910
- [14] Motoyama K, Inoue H, Mimori K, et al. Clinicopathological and prognostic significance of PDCD4 and micro RNA-21 in human gastric cancer [J]. *Int J Oncol*, 2010, 36: 1089-1095
- [15] Mudduluru G, Medved F, Grobholz R, et al. Loss of programmed cell death 4 expression marks adenoma-carcinoma transition, correlates inversely with phosphorylated protein kinase B, and is an independent prognostic factor in resected colorectal cancer [J]. *Cancer*, 2007, 110: 1697-1707
- [16] Fassan M, Caqol M, Pennelli G, et al. Programmed cell death 4 protein in esophageal cancer [J]. *Oncol Rep*, 2010, 24: 135-139
- [17] Fan H, Zhao Z, Quan Y, et al. DNA methyltransferase 1 knockdown induces silenced CDH1 gene reexpression by demethylation of methylated CpG in hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2007, 19(11):952-961
- [18] Gao F, Wang X, Zhu F, et al. PDCD4 gene silencing in gliomas is associated with 5' CpG island methylation and unfavorable prognosis. *J Cell Mol Med*, 2008, 13(10):4257-4267
- [19] 戴兵, 薛建锋, 李仁锋, 等. DNMT1、PDCD4 在肝癌组织中的表达及临床意义. *山东医药*, 2008, 48(41):36-37

Dai Bing, Xue Jian-feng, Li Ren-feng, et al. The expression and significance of DNMT1 and PDCD4 in patients with liver cancer. *Medicine of Shandong*, 2008, 48(41):36-37