

# 子宫内膜息肉和子宫内膜癌组织中雌激素受体 $\beta$ 甲基化与 Survivin、Ki-67 的表达研究及临床意义

姚 微,花敏慧,黄 华,仲建新\*

(南通大学附属医院妇产科,江苏 南通 226001)

**[摘要]** 目的:检测正常子宫内膜、子宫内膜息肉及子宫内膜癌中雌激素受体  $\beta$  (estrogen receptor  $\beta$ , ER $\beta$ ) 基因启动子区 CpG 岛甲基化状态,及以上组织中 Survivin、Ki-67 的表达,探讨其中 ER $\beta$  启动子甲基化与 Survivin、Ki-67 表达的关系,分析其中的联系,探讨子宫内膜息肉组织的增生和细胞凋亡机制。方法:运用甲基化特异性 PCR(MSP)检测 40 例正常子宫内膜、40 例子官内膜息肉组织及 26 例子官内膜癌组织 ER $\beta$  甲基化情况,同时采用免疫组化 ELIVISION™ 二步法检测以上组织中 Survivin、Ki-67 基因蛋白的表达。结果:正常子宫内膜及子宫内膜息肉组织中 ER $\beta$  基因甲基化较子宫内膜癌组织中 ER $\beta$  基因甲基化显著降低 ( $P < 0.05$ )。正常子宫内膜组织中 Survivin 表达较子宫内膜息肉组织与子宫内膜癌组织的 Survivin 蛋白表达显著降低 ( $P < 0.05$ )。正常子宫内膜及子宫内膜息肉中 Ki67 表达较子宫内膜癌组织中明显降低 ( $P < 0.05$ )。子宫内膜息肉及子宫内膜癌组织中 Survivin 及 Ki67 阳性表达与 ER $\beta$  基因启动子甲基化均呈正相关。结论:ER $\beta$  基因甲基化是子宫内膜息肉发生的影响因素之一,子宫内膜组织中 ER $\beta$  基因甲基化可能与子宫内膜息肉的产生、细胞增殖、复发和进一步发展及预后密切相关。

**[关键词]** 子宫内膜息肉;雌激素受体  $\beta$ ;DNA 甲基化;CpG 岛;甲基化特异性 PCR;Survivin 蛋白 Ki-67 蛋白

**[中图分类号]** R737.33

**[文献标志码]** B

**[文章编号]** 1007-4368(2014)12-1744-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20141237

近年来,随着妇科宫腔镜和阴道超声技术的发展,子宫内膜息肉(endometrial polyp, EP)已成为临床常见妇科疾病。在全球妇女人群中 EP 的患病率约为 25.0%,其恶变率为 1.0%~1.6%,绝经后妇女的发病率较育龄妇女高,为 35.0%,其恶变及癌前病变率亦高达 10%<sup>[1]</sup>。EP 是异常子宫出血的常见原因,也是导致不孕的原因之一,发病原因尚不清楚,目前多数学者认为与内分泌紊乱有关。故难以根治且易于复发。目前,关于 EP 的病因主要有两种学说:一种为炎症刺激学说;另一种为激素刺激学说。EP 与雌激素受体(ER)表达、变异及沉默的关系有待进一步研究。有研究表明,DNA 甲基化与大多数肿瘤的发生相关,抑癌基因启动子 CpG 岛的高甲基化可引起抑癌基因表达沉默,细胞出现无节制生长,导致肿瘤的发生<sup>[2]</sup>。本研究通过检测 EP、正常子宫内膜及子宫内膜癌组织中 ER 基因甲基化和 Survivin 蛋白, Ki-67 蛋白的表达结合临床资料,探讨 EP 的发病机制,为 EP 治疗及预防复发提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

南通大学附属医院 2009 年 6 月~2011 年 1 月行子宫切除和诊刮的正常子宫内膜、在宫腔镜直视下取内膜息肉新鲜组织标本和因子宫内膜癌手术标本,一部分用液氮收集-70℃低温保存,另一部分标本置福尔马林固定,石蜡包埋,HE 染色组织病理学检查。包括 40 例正常子宫内膜组织,40 例 EP 组织和 26 例子官内膜癌组织。病理组织学分型:EP 患者 40 例,子宫内膜癌患者中内膜样腺癌 20 例,浆液性乳头状腺癌 3 例,腺鳞癌 2 例,透明细胞癌 1 例。所选病例近 3 个月均无使用激素史。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 免疫组化

所用一抗及 ELIVISION 试剂盒 (PV-9000) 和 DAB 酶底物显色试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司)。标本均用甲醛固定,常规石蜡包埋切片。免疫组织化学采用 EliVision 二步法,柠檬酸盐缓冲液高温高压抗原修复、DAB 显色,用阳性备用切片作阳性对照,用 PBS 代替一抗作阴性对照。镜下观察 Survivin 及 Ki67 以细胞核出现棕黄色或棕

**[基金项目]** 南通大学附属医院科研项目资助(TDFY0937)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: ntzjx1965@126.com

色颗粒的细胞为阳性细胞。每张切片随机选择 10 个高倍视野,每个视野随机观察 100 个细胞,计算其中阳性细胞比例。阳性细胞比例  $\leq 20\%$  为(-),  $20\% \sim 50\%$  为 (+),  $50\% \sim 75\%$  为 (++) ,  $\geq 75\%$  为 (+++)。

### 1.2.2 DNA 提取及亚硫酸氢盐修饰转化

EZ DNA 甲基化试剂盒 (Direct Catalog No D5020) 为北京天漠科技开发有限公司产品。取低温保存组织标本,室温融化,经蛋白酶 K 消化,  $50^{\circ}\text{C}$  孵育 20 min。再直接进行亚硫酸氢盐转化:①  $98^{\circ}\text{C}$  8 min;②  $64^{\circ}\text{C}$  3.5 h;③  $4^{\circ}\text{C}$  18~20 h。DNA 经亚硫酸氢盐修饰后,CpG 岛中的非甲基化胞嘧啶(C)转变为尿嘧啶(U),经 PCR 扩增后转变为胸腺嘧啶(T);而 CpG 岛中的甲基化胞嘧啶(C)仍保留为胞嘧啶。CpG 岛以外序列中的胞嘧啶(C)均转变为尿嘧啶(U),经 PCR 扩增后均为胸腺嘧啶(T)。洗脱 DNA:按照试剂盒上的操作步骤洗脱 DNA。

### 1.2.3 聚合酶链反应扩增 ER $\beta$ 基因

ER $\beta$  基因启动子序列号为 AF191544。各个引物序列详见表 1。均由上海生物工程公司合成。非甲基化引物 U、甲基化引物 M 分别扩增经修饰后的非甲基化和甲基化启动子区,目标基因片段分别长 165 bp 和 163 bp。所用试剂如下:PCR 试剂盒(型号:Zymo Tap PreMix,批次 E2003,北京天漠科技开发有限公司)。PCR 扩增仪(C1000,BIO-RAD 公司,美国),离心机(CT15RE,HITACHI 公司,日

本),紫外凝胶分析系统 (ChemiDoc<sup>TM</sup>XRS+,BIO-RAD 公司,美国)。25  $\mu\text{l}$  的反应体系含:Zymo Tap PreMix 12.5  $\mu\text{l}$ 、水 8.5  $\mu\text{l}$ 、上游引物和下游引物各 1  $\mu\text{l}$ 、DNA 模板 2  $\mu\text{l}$ 。反应条件:预变性  $95^{\circ}\text{C}$  10 min,35 个循环(变性  $95^{\circ}\text{C}$  1 min,退火  $54^{\circ}\text{C}$  40 s,  $72^{\circ}\text{C}$  1 min),  $72^{\circ}\text{C}$  7 min 延伸,  $4^{\circ}\text{C}$  保存。PCR 产物经 1 $\times$  琼脂糖凝胶电泳,溴化乙啶(EB)染色,紫外凝胶分析系统观察拍照。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件包进行统计分析。组间阳性率差异的分析采用  $\chi^2$  检验,相关性检验采用定性资料相关分析,以  $\alpha=0.05$  为显著性检验标准。

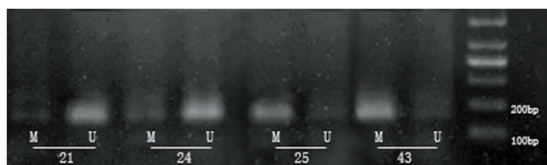
## 2 结 果

### 2.1 ER $\beta$ 基因启动子甲基化情况

EP 组织 ER $\beta$  基因启动子甲基化率 25.0%(10/40 例),正常子宫内膜甲基化率 10.0%(4/40 例),子宫内膜癌组织中 ER $\beta$  基因启动子甲基化率 69.23%(18/26 例)。正常子宫内膜组织、EP 组织及子宫内膜癌组织中 ER $\beta$  基因启动子甲基化结果(图 1):正常子宫内膜组织较子宫内膜癌组织中的 ER $\beta$  基因启动子甲基化明显降低( $\chi^2=24.87, P < 0.05$ ),EP 组织较子宫内膜癌组织的 ER $\beta$  基因启动子甲基化率明显降低( $\chi^2=12.62, P < 0.05$ ),EP 组织与正常内膜组织中的 ER $\beta$  基因启动子甲基化率差异无统计学意义( $\chi^2=2.62, P > 0.05$ ,表 2)。

表 1 ER $\beta$  基因启动子甲基化及非甲基化引物

引物	起始	大小(bp)	温度( $^{\circ}\text{C}$ )	GC 含量(%)	引物序列(5'→3')
上游甲基化引物	1 406	25	58.99	64.00	TTGTTATTTTAGGGTTCGAGGTTAC
下游甲基化引物	1 571	23	59.46	65.22	ACCAATCTAAAAACCACACTTCG
上游非甲基化引物	1 409	24	55.40	66.67	TTATTTTAGGGTTTGAGGTTATGT
下游非甲基化引物	1 572	24	59.01	62.50	AACCAATCTAAAAACCACACTTCA



M: 甲基化;U: 非甲基化;21: 正常子宫内膜;24、25: EP;43: 子宫内膜癌。

图 1 正常子宫内膜、EP 及子宫内膜癌 ER $\beta$  启动子甲基化

### 2.2 Survivin 蛋白的表达

正常子宫内膜中 Survivin 阳性率为 25.0%(10/40),EP 组织为 45.0%(18/40);子宫内膜癌 73.0%(19/26)。子宫内膜息肉中 Survivin 表达与正常子宫内膜

中差异无统计学意义( $\chi^2=3.51, P > 0.05$ ),子宫内膜癌组织中 Survivin 表达较正常子宫内膜中明显增高( $\chi^2=14.78, P < 0.01$ ),EP 组织中 Survivin 表达较子宫内膜癌组织中降低( $\chi^2=5.04, P < 0.05$ ,表 2,图 2)。

### 2.3 Ki-67 蛋白的表达

正常子宫内膜中 Ki-67 阳性率为 2.5%(1/40),EP 组织为 12.5%(5/40),子宫内膜癌为 46.2%(12/26)。正常子宫内膜中 Ki-67 表达较 EP 中差异无统计学意义( $\chi^2=2.88, P > 0.05$ ),较子宫内膜癌组织中明显降低( $\chi^2=28.72, P < 0.01$ ),EP 较子宫内膜癌组织中明显降低( $\chi^2=17.46, P < 0.01$ ,表 2,图 2)。

表2 不同子宫内膜组织中 ERβ 基因启动子甲基化及 Survivin、Ki67 蛋白的表达

组织	ERβ			Survivin			Ki67		
	甲基化	非甲基化	甲基化率(%)	阳性例数	阴性例数	阳性率(%)	阳性例数	阴性例数	阳性率(%)
正常子宫内膜	4	36	10.0	10	30	25.0	1	39	2.5
子宫内膜息肉	10	30	25.0	18	22	45.0	5	35	12.5
子宫内膜癌	18	8	69.2*	19	7	73.0* <sup>##</sup>	12	14	46.2* <sup>###</sup>

与正常子宫内膜比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与子宫内膜息肉比较, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ 。

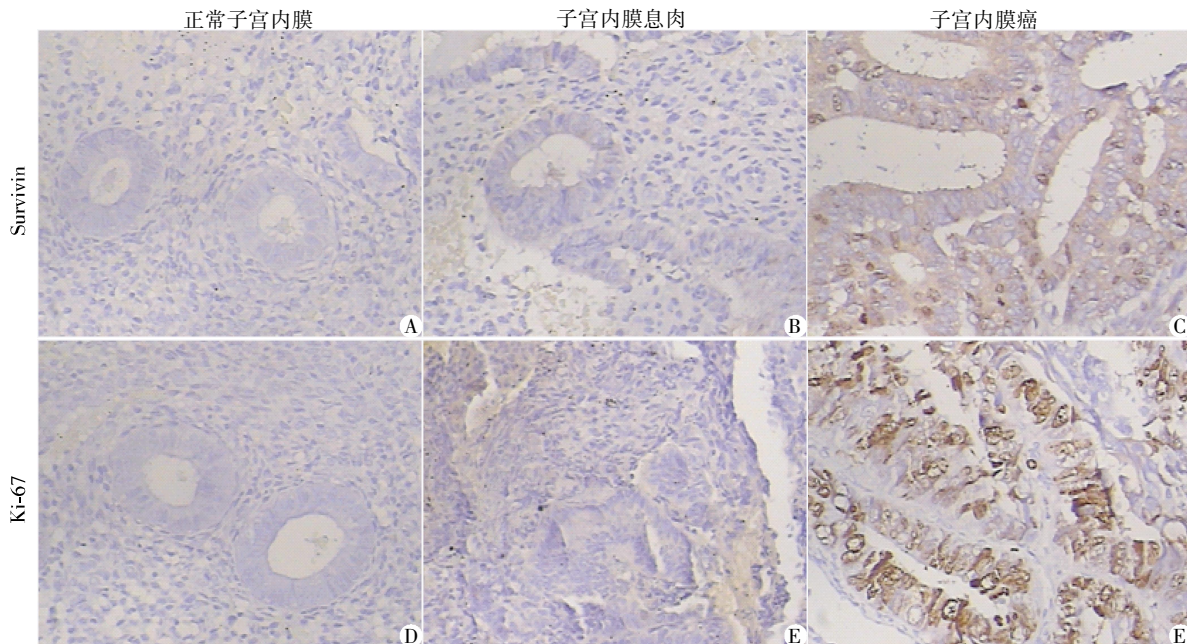


图2 免疫组化检测 Survivin 和 Ki-67 在各组中的表达情况

### 2.4 Survivin 及 Ki67 表达与 ERβ 基因启动子甲基化的关系

EP 组织中 Survivin 阳性表达与 ERβ 基因启动子甲基化呈正相关( $r = 0.406, P < 0.05$ ), 子宫内膜息肉组织中 Ki-67 阳性表达与 ERβ 基因启动子甲基化呈正相关( $r = 0.404, P < 0.05$ )。子宫内膜癌组织中 Survivin 阳性表达与 ERβ 基因启动子甲基化呈正相关( $r = 0.639, P < 0.005$ ), 子宫内膜癌组织中 Ki-67 阳性表达与 ERβ 基因启动子甲基化呈正相关( $r = 0.35, P < 0.05$ )。

### 3 讨论

本研究中 EP 与肥胖, 高血压和糖尿病关系不大, 但肥胖、糖尿病、少产属于子宫内膜癌的高危因素早已得到证实。EP 的发生发展及复发可能与某些癌基因和抑癌基因表达或缺失有关。

Survivin 是最强的肿瘤凋亡抑制因子之一, 在许多癌组织中高表达, 可抑制半胱天冬酶(caspase)和 P53 等诱导的细胞凋亡<sup>[3]</sup>。Survivin 通过抑制内腺细胞的凋亡机制、促进其异常增殖导致子宫内膜

息肉发生甚至恶性转化而导致内膜癌的发生。本研究检测该蛋白的表达, 得出子宫内膜癌组织、子宫内膜息肉组织、正常子宫内膜中 Survivin 表达逐渐降低。Survivin 在多数实体瘤中表达增加, 而正常组织中几乎不表达, 并且与化疗抵抗、肿瘤复发和肿瘤患者生存期有关, 使其为有潜在价值的肿瘤标志<sup>[4]</sup>。近来有研究表明, Survivin 阳性表达与雌、孕激素受体呈正相关<sup>[5]</sup>。本研究通过分析得出子宫内膜息肉及子宫内膜癌组织中 Survivin 阳性表达与 ERβ 基因启动子甲基化呈正相关, 故 ERβ 基因启动子甲基化与肿瘤细胞凋亡抑制密切相关, 从而与肿瘤细胞增殖有关。目前, Survivin 分子靶向治疗的 I/II 期临床试验在多种肿瘤中进行, 安全性较好, 但疗效甚弱, 联合治疗疗效及分子机制需进一步研究<sup>[6-7]</sup>。

Ki-67 是一种在细胞 G1、S、M、G2 期均会出现的核抗原, 表达的高低反映细胞增殖的程度<sup>[9]</sup>。在子宫内膜周期中, Ki-67 的表达高峰在增生期, 是测量子宫内膜增生的标记。有研究发现, ER 能调节与细胞分裂有关的基因, 影响细胞的凋亡、分裂与增殖, 从而对肿瘤细胞的增殖、代谢与分化进行调控, 最

终影响肿瘤的生物行为。Crow 等<sup>[9]</sup>提出子宫内膜异常增生与体内长期雌激素刺激有关,雌激素的作用可增加 ER、孕激素受体(PR)的数量,使蛋白合成增加。近年来在对育龄女性的研究中发现,并非 ER、孕激素受体(PR)都参与了子宫内膜息肉的形成,ER 在其中起着更为重要的作用。增殖活性的检测对于疾病的发生、发展及选择适当的治疗措施意义重大。本研究发现,与正常内膜组比较,Ki-67 阳性细胞率在内膜癌组明显增高( $P < 0.05$ ),表明有更多的内膜细胞进入细胞周期,从而使内膜出现异常增生;而息肉组未有明显增高( $P > 0.05$ ),表明息肉细胞增生并不活跃。

另外本研究还检测了正常子宫内膜及子宫内膜息肉、子宫内膜癌中 ER $\beta$  基因启动子区 CpG 岛甲基化状态,分析基因甲基化与细胞增殖因子之间的内在联系。DNA 甲基化作为表观遗传学的一种调控机制是最早被人们发现的,它与肿瘤的发生有着密切关系。ER 基因的启动子区和外显子 1 区富含 CpG 岛,CpG 岛的甲基化则会抑制基因转录,导致其失表达。本研究得出 EP 组织较子宫内膜癌组织的 ER $\beta$  基因启动子甲基化率显著降低。而 EP 组织与正常子宫内膜组织中的 ER $\beta$  基因启动子甲基化率无显著差异。影响细胞增殖的因素很多,ER 的表达与细胞增殖之间的相关性已在正常及恶性转化子宫内膜中得到证实。EP 中 ER $\beta$  表达缺失与 ER $\beta$  基因启动子甲基化有关。本研究结果显示,EP 及子宫内膜癌组织中 Survivin 阳性表达与 ER $\beta$  基因启动子甲基化呈正相关,EP 及子宫内膜癌组织中 Ki-67 阳性表达与 ER $\beta$  基因启动子甲基化亦呈正相关,即表明 ER $\beta$  基因启动子甲基化与细胞凋亡抑制因子表达正相关,亦与细胞增殖呈正相关。

#### [参考文献]

- [1] Yildizhan B, Yildizhan R, Ozkesici B, et al. Transvaginal ultrasonography and saline infusion sonohysterography for the detection terine bleeding[J]. Int Med Res, 2008, 36(6): 1205-1213
- [2] Paulsen M, Ferguson-Smith AC. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease[J]. J Pathol, 2001, 195 (1): 97-110
- [3] Nasar A, Sexton D, Cotsonis G, et al. Survivin expression in breast carcinoma: correlation with apoptosis and prognosis [J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2008, 16(3): 221
- [4] 丁 莉, 顾海燕, 陈玲英, 等. 米非司酮对子宫肌瘤及子宫肌层组织 Caspase-3 与 Survivin 表达的影响[J], 中国妇幼保健, 2012, 27(3): 346-347
- [5] 张 旭, 杨越波, 李小毛, 等. Survivin、ER、PR 在子宫内膜癌组织中的表达及相关性分析[J]. 实用医学杂志, 2011, 27(10): 1788-1792
- [6] Giaccone G, Zatloukal P, Roubec J, et al. Multicenter phase II trial of YM155, a small-molecule suppressor of survivin, in patients with advanced, refractory, non-small-cell lung cancer[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(27): 4481-4486
- [7] Satoh T, Okamoto I, Miyazaki M, et al. Phase I study of YM155, a novel survivin suppressant, in patients with advanced solid tumors [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15 (11): 3872-3880
- [8] 李艳东, 郑建云, 刘 冰. E-cadherin、p16 及 Ki67 在宫颈上皮内瘤变诊断中的应用[J]. 山西医科大学学报, 2011, 42(11): 44-45
- [9] 郭伟男, 孙丽敏, 郑小霞, 等. ER、PR 和 GLUT-1 在子宫内膜息肉中的表达及意义 [J]. 河北医药, 2012, 34 (11): 1632-1633

[收稿日期] 2014-03-23