

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.08.003

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.08.003

DNMT3L 在卵巢恶性生殖细胞肿瘤中的表达及其临床病理特征

丁晓燕¹, 张采欣², 周磊², 孔庆暖²

(1. 青岛大学附属医院病理科, 山东 青岛 266011; 2. 青岛市市立医院病理科, 山东 青岛 266071)

[摘要] **目的:** 探讨DNMT3L(DNA methyltransferase 3-like)蛋白在不同种类卵巢恶性生殖细胞肿瘤中的表达及其在生殖细胞肿瘤发生发展过程中的作用。**方法:** 收集卵巢恶性生殖细胞肿瘤59例, 包括原始生殖细胞肿瘤52例及未成熟性畸胎瘤7例, 原始生殖细胞肿瘤包括胚胎性癌10例, 卵黄囊瘤22例, 无性细胞瘤13例, 混合性生殖细胞肿瘤7例; 同时收集非生殖细胞肿瘤17例, 包括浆液性癌5例, 颗粒细胞瘤5例, 卵泡膜细胞瘤7例, 采用SP免疫组织化学方法检测肿瘤组织中的DNMT3L蛋白的表达情况, 并结合临床病理特征及组织学类型进行统计学分析。**结果:** DNMT3L主要在原始生殖细胞肿瘤表达, 总体阳性率为73.1%(38/52), 其中混合性生殖细胞肿瘤阳性表达率为85.7%(6/7), 无性细胞瘤阳性表达率为84.6%(11/13), 卵黄囊瘤中阳性表达率为68.2%(15/22), 胚胎性癌阳性表达率为60%(6/10)。DNMT3L在7例未成熟畸胎瘤及17例非生殖细胞肿瘤中均未见阳性表达。临床病理特征分析显示DNMT3L阳性表达率与原始生殖细胞肿瘤的FIGO分期有关, 与年龄及肿瘤大小等无关。**结论:** DNMT3L在原始生殖细胞肿瘤阳性表达率高, 对其诊断具有较好的敏感性和特异性, DNA甲基化的改变可能在卵巢原始生殖细胞肿瘤的发生过程中起到重要作用。

[关键词] 生殖细胞肿瘤; 卵巢; DNA甲基化转移酶3L

Expression of DNMT3L in ovarian germ cell tumors and its clinicopathological features

DING Xiaoyan¹, ZHANG Caixin², ZHOU Lei², KONG Qingnuan²

(1. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong 266011;

2. Department of Pathology, Qingdao Municipal Hospital, Qingdao Shandong 266071, China)

Abstract **Objective:** To investigate the expression patterns of DNA methyltransferase 3-like (DNMT3L) protein in malignant ovarian germ cell tumors and the underlying roles in the pathogenesis of germ cell tumors. **Methods:** A total of 59 cases of ovarian malignant germ cell tumors were collected which include 52 cases primitive germ cell tumors and 7 cases immature teratoma. Primitive germ cell tumors included 10 cases embryonal carcinoma, 22 cases yolk sac tumors, 13 cases dysgerminoma, and 7 cases mixed germ cell tumors; meanwhile 17 cases non-germ cell tumors were collected including 5 cases serous adenocarcinoma, 5 cases granulose cell tumors and 7 cases. SP

收稿日期 (Date of reception): 2018-06-10

通信作者 (Corresponding author): 孔庆暖, Email: nuanyun4621@126.com

基金项目 (Foundation item): 青岛市医疗卫生重点学科建设项目 (YQ2017Y17)。This work was supported by the Qingdao Key Health Discipline Development Fund, China (YQ2017Y17).

immunohistochemistry was performed to detect the DNMT3L expression in tumor tissues. The relationship with clinical-pathologic features and histological categories were analyzed. **Results:** DNMT3L was mainly expressed in primitive germ cell tumors, with total 73.1% (38/52) positive expression, 85.7% (6/7) positive expression for mixed germ cell carcinoma, 84.6% (11/13) for dysgerminoma, 68.2% (15/22) for yolk sac tumors and 60% (6/10) for embryonal carcinoma. The expression of DNMT3L was negative in 7 cases immature teratoma and 17 cases non-germ cell carcinoma. DNMT3L-positive proportion correlated to FIGO staging and had no correlations to age and tumor size. **Conclusion:** DNMT3L has a high positive rate in the primitive germ cell tumor and has a good sensitivity and specificity for its diagnosis. The change of DNA methylation may play an important role in the process of ovarian primitive germ cell tumor.

Keywords germ cell tumor; ovary; DNA methyltransferase 3-like protein

卵巢恶性生殖细胞肿瘤是一组来源于不同分化阶段胚胎性腺原始生殖细胞的肿瘤,好发于年轻女性,种类多样,组织学特征各不相同,发病率占卵巢原发肿瘤的5%^[1]。恶性生殖细胞肿瘤中最为常见的是原始生殖细胞肿瘤及未成熟畸胎瘤,前者包括无性细胞瘤、卵黄囊瘤(内胚窦瘤)、胚胎性癌,恶性程度高,生长迅速;后者根据不成熟组织成分所占比例分为0~4级^[2]。虽然近年来恶性生殖细胞肿瘤的诊断和治疗均已取得较大进展,治愈率可达75%~100%^[3],但此类肿瘤的发生、发展及病因学机制尚未明确,寻找新的肿瘤标志物并探究其癌变机制具有重要意义。DNMT3L(DNA methyltransferase 3-like)是DNA甲基化转移酶的一种,其在结构上与其他两种DNA甲基化转移酶(DNMT3A和DNMT3B)具有高度同源性,可以与DNMT3A相互作用启动从头甲基化机制^[4]。相关研究^[5]表明:DNMT3L可以在胚胎干细胞及多能生殖干细胞中阳性表达。Minami等^[6]的研究结果显示:DNMT3L可能是睾丸胚胎性癌新的特异性标志物,在鉴别精原细胞瘤及胚胎性癌中具有重要价值。因此,本研究选取59例生殖细胞肿瘤及17例非生殖细胞肿瘤行免疫组织化学染色,结合临床病理特征探讨DNMT3L在卵巢恶性生殖细胞肿瘤中的表达及DNA甲基化在生殖细胞肿瘤发生、发展中的作用。

1 对象与方法

1.1 对象

收集青岛市市立医院及青岛大学附属医院2013至2015年卵巢原发的生殖细胞肿瘤患者共59例,年龄11~49(中位31.3)岁,其中胚胎性癌10例,卵黄囊瘤22例,无性细胞瘤13例,混合性生殖细胞

肿瘤7例(包括3例未成熟畸胎瘤与胚胎性癌混合,2例卵黄囊瘤与胚胎性癌混合及1例无性细胞瘤,未成熟畸胎瘤与卵黄囊瘤混合),未成熟畸胎瘤7例(未成熟成分均为原始神经管)。另选取17例非生殖细胞肿瘤为对照组,其中包括卵泡膜细胞瘤7例,颗粒细胞瘤5例,浆液性腺癌5例(低级别2例,高级别3例),年龄25~47(中位45.2)岁。所有病例经2名富有经验的病理诊断医师确诊,并根据国际妇产科联盟(International Federation of Gynecology and Obstetrics, FIGO)分期标准进行分期,患者均未行术前放射或化学治疗,腹腔冲洗液均未见肿瘤细胞。本研究经青岛市市立医院伦理委员会审核批准,患者均知情同意。

1.2 方法

所有标本取材后经4%中性甲醛固定,常规脱水及石蜡包埋后,行4 μm连续切片,40 min烤片后二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,采用链霉素抗生物素-过氧化物酶染色法(SP法)进行免疫组织化学染色,具体步骤如下:经PBS冲洗3次,5 min/次,将切片放入高压锅内,使乙二胺四乙酸(EDTA)抗原修复液能没过组织切片,进行高压修复,待高压阀开始转动并有水蒸气从高压阀处开始冒出时,温度迅速调到100 ℃,倒计时90 s,打开高压锅,自然冷却至室温。经PBS冲洗3次,5 min/次,然后加入3%过氧化氢孵育30 min去除内源性过氧化物酶,PBS冲洗3次,5 min/次,滴加动物血清室温封闭15 min,滴加50 μL一抗(DNMT3L,兔抗人多克隆抗体,1:100,美国Abcam公司),37 ℃孵育1.5 h,PBS冲洗3次,5 min/次,滴加50 μL二抗(酶标羊抗小鼠/兔IgG聚合物,北京中杉金桥生物技术有限公司),37 ℃孵育10 min,PBS冲洗后3次,5 min/次。DAB显色3 min,苏木精复染30 s,梯度乙醇脱

水,二甲苯透明后中性树胶封片。两种抗体均设有阳性对照及阴性对照, PBS溶液代替一抗作为阴性对照, 阳性对照应用已知阳性切片。

1.3 结果判读及分析

免疫组织化学结果采用双盲法判定, 由病理科2名高年资主治医师独立阅片后判定。结果分析以着色细胞百分数及染色强度为观察指标, 每张切片随机选取5个具有代表性的高倍视野进行综合判断, 取其平均值进行对比分析, 具体标准如下: 着色细胞百分数, <5%为0分, 5%~<25%为1分, 25%~50%为2分, >50%为3分; 染色程度, 不着色为0分, 淡黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分。两者相乘记为总分, 1~<4分为阴性, 4~9分为阳性。

1.4 统计学处理

应用Graphpad Prism5软件进行分析, 采用卡方检验Fisher's精确概率法, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DNMT3L 在恶性生殖细胞肿瘤中的表达

DNMT3L蛋白主要在细胞质和细胞核中阳性表达, 呈现出深浅不一、粗细不等的棕黄色颗粒。DNMT3L在原始生殖细胞肿瘤表达明显升高, 呈棕黄色强表达, 在胚胎性癌、无性细胞瘤、卵黄囊瘤及混合性生殖细胞肿瘤中均有不同程度的表达。其中7例混合性生殖细胞肿瘤中, 有6例细胞质阳性表达, 混合性生殖细胞肿瘤包括3例未成熟畸胎瘤与胚胎性癌混合, 2例卵黄囊瘤与胚胎性癌混合及1例无性细胞瘤, 未成熟畸胎瘤与卵黄囊瘤混合, 主要在肿瘤中的胚胎性癌、无性细胞瘤及卵黄囊瘤成分中表达, 未成熟畸胎瘤未见表达, 总体阳性率为85.7%(6/7)。13例无性细胞瘤中, 11例细胞质及细胞核阳性表达, 阳性率为84.6%(11/13); 22例卵黄囊瘤中, 15例细胞质阳性表达, 阳性率为68.2%(15/22); 10例胚胎性癌中, 6例细胞质阳性表达, 阳性率为60%(6/10); 总阳性表达率为73.1%(38/52); 7例未成熟畸胎瘤中, 恶性的神经管成分均未表达; DNMT3L在卵巢原始生殖细胞肿瘤及未成熟畸胎瘤中的阳性表达率差异有统计学意义($P=0.0002$, 图1)。

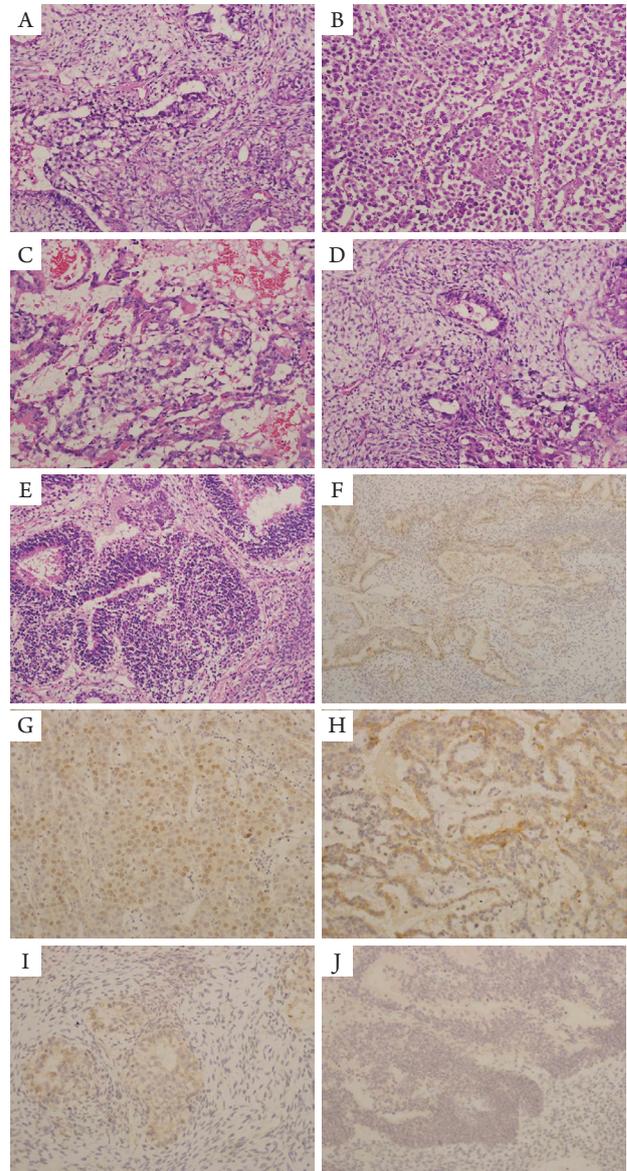


图1 DNMT3L在卵巢恶性生殖细胞肿瘤中的表达(HE及免疫组织化学染色, $\times 100$)

Figure 1 Expression of DNMT3L in ovarian malignant germ cell tumors (HE and IHC staining, $\times 100$)

DNMT3L在混合性生殖细胞肿瘤(A)中细胞质阳性表达(F), 在无性细胞(B)中细胞质及细胞核阳性表达(G), 在卵黄囊瘤(C)中细胞质阳性表达(H), 在胚胎性癌(D)中细胞质阳性表达(I), 在未成熟畸胎瘤(E)中阴性表达(J)。

DNMT3L is positively expressed in cytoplasm (F) of mixed germ cell carcinoma (A), in cytoplasm and nucleus (G) of dysgerminoma (B), in cytoplasm (H) of yolk sac tumor (C) and in cytoplasm (I) of embryonal carcinoma (D), negatively (J) expressed in immature teratoma (E).

2.2 DNMT3L在17例非生殖细胞肿瘤中的表达

DNMT3L在浆液性腺癌及卵泡膜细胞瘤中表达量低,呈淡黄色弱表达(图2),在5例浆液性腺癌中,1例阳性表达,阳性率为20%(1/5);7例卵泡膜细胞瘤中,1例阳性表达,阳性率为14.3%(1/7);5例颗粒细胞瘤均阴性表达,总阳性表达率为11.8%(2/17)。DNMT3L在卵巢原始生殖细胞肿瘤及非生殖细胞肿瘤中的阳性表达率差异有统计学意义($P<0.0001$,表1)。

2.3 DNMT3L表达与卵巢原始生殖细胞肿瘤临床病理特征相关性

DNMT3L主要在原始生殖细胞肿瘤中高表达,因此进一步分析了DNMT3L表达与原始生殖细胞肿瘤患者临床病理资料之间的关系,结果显示:DNMT3L的表达与肿瘤FIGO分期相关($P=0.03$),与患者年龄、肿瘤大小、淋巴结转移以及肿瘤为单侧/双侧均无相关性(均 $P>0.05$,表2)。

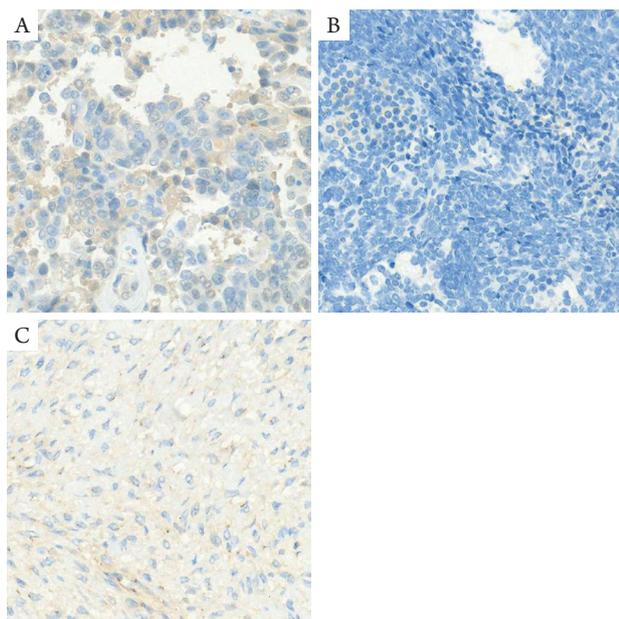


图2 DNMT3L在卵巢非生殖细胞肿瘤中的表达(免疫组织化学染色, $\times 200$)

Figure 1 Expression of DNMT3L in ovarian non-germ cell tumors (IHC staining, $\times 200$)

DNMT3L在浆液性癌中细胞质弱阳性表达(A),在颗粒细胞瘤阴性表达(B),在卵泡膜细胞瘤细胞质弱阳性表达(C)。

DNMT3L is weakly positively expressed in serous adenocarcinoma (A), negatively expressed in granular cell tumor (B) and weakly positively expressed in theca cell tumor (C).

表1 DNMT3L在不同卵巢肿瘤中的表达差异

Table 1 Expression difference of DNMT3L in ovarian tumors

组别	n	DNMT3L		P
		+	-	
原始生殖细胞肿瘤	52	38	14	—
未成熟畸胎瘤	7	0	7	0.0002***
非生殖细胞肿瘤	17	2	15	<0.0001***

与原始生殖细胞肿瘤相比, *** $P<0.001$ 。

Compared with the primordial germ cell tumor, *** $P<0.001$.

表2 DNMT3L表达与卵巢原始生殖细胞肿瘤临床病理特征的相关性

Table 2 Correlations between DNMT3L expression and clinicopathological features of ovarian primitive cell tumors

组别	n	DNMT3L		P
		-	+	
年龄/岁				0.87
<20	31	8	23	
≥ 20	21	5	16	
FIGO分期				0.03
I	15	7	8	
II~III	37	6	31	
肿瘤直径/cm				0.39
<10	35	10	25	
≥ 10	17	3	14	
单侧/双侧				0.20
单侧	28	9	19	
双侧	24	4	20	
淋巴结转移				0.73
有	18	4	14	
无	34	9	25	

3 讨论

卵巢恶性生殖细胞肿瘤包括卵黄囊瘤、未成熟畸胎瘤、无性细胞瘤、胚胎性癌、以及混合性生殖细胞瘤等多种肿瘤,因肿瘤种类繁多,组织学形态多样,不同生殖细胞肿瘤之间鉴别诊断十分困难,虽然锌指转录蛋白4(SALL4)、八

聚体结合蛋白4(OCT4)、磷脂酰肌醇蛋白多糖3(Glypian-3)等新型免疫组织化学抗体的运用可辅助诊断部分肿瘤,但其特异性及敏感性各不相同,临床病理诊断过程中仍需要更多的精准抗体联合应用进行综合判断。研究^[6]显示DNMT3L是睾丸胚胎性癌的特异性标志物。为进一步探讨DNMT3L在卵巢恶性生殖细胞肿瘤中的表达及临床应用价值,本研究应用免疫组织化学方法对不同种类的卵巢恶性生殖细胞肿瘤进行DNMT3L染色,结果表明:DNMT3L在原始生殖细胞肿瘤中表达水平明显增高,其中在混合性生殖细胞肿瘤及无性细胞瘤中阳性表达率均在80%以上,明显高于非生殖细胞肿瘤,在未成熟畸胎瘤中未见表达。

据文献[7-8]报道:OCT4及SALL4是原始生殖细胞肿瘤的重要肿瘤标志物,在肿瘤发生、发展中起重要作用。在正常组织中,OCT4及SALL4均仅在胚胎干细胞中表达,在成熟体细胞中不表达,二者均是维持胚胎生殖细胞多功能所需的重要转录因子^[9-10]。DNA甲基化是细胞开闭基因表达的一种方式。DNA甲基化通过不改变DNA的结构对组织特异性基因的表达进行调控。非甲基化或低甲基化状态可以促进基因的表达,高甲基化状态抑制其表达。OCT4及SALL4在原始生殖细胞肿瘤中的高表达可能与基因的甲基化状态改变从而导致的相关的基因表达调控失活有关^[5,11]。

DNA甲基化由主要在DNA甲基化转移酶(DNMTs)的催化作用下完成, DNMT3L是DNA甲基化转移酶的一种亚型, DNA甲基化转移酶在DNA甲基化过程中催化甲基基团转移至DNA序列的5'胞嘧啶上,是胚胎发育过程中的重要环节,可通过调节基因启动子区的甲基化导致基因组印迹、X染色体灭活,并具有影响端粒酶的完整性以及参与组蛋白修饰等重要功能^[12]。研究^[11,13]表明:DNMT3L虽然不具有催化活性,但可以调节其他两种从头合成甲基化转移酶DNMT3A及DNMT3B的表达活性。DNMT3L在小鼠胚胎干细胞中表达量最高,随着胚胎干细胞分化成熟, DNMT3L表达量逐渐减少,出生后第6天表达基本消失^[14-15]。早期生殖细胞DNMT3L的丢失和精母细胞瘤减数分裂失败密切相关^[16]。

最新研究^[17]证实: Sirt1基因可以通过拮抗DNMT3L表达在胚胎干细胞的分化及甲基化进程起重要作用。Minami等^[6]研究表明: DNMT3L在胚胎性癌的组织学标本及两种胚胎性癌的细胞系中均有高表达,在其他上皮性肿瘤及生殖细

胞肿瘤中不表达。但本研究结果与其不一致: DNMT3L在卵巢混合性生殖细胞肿瘤,无性细胞瘤、胚胎性癌及卵黄囊瘤中均有表达, DNMT3L能够鉴别原始生殖细胞肿瘤,但无法进行准确分类,可能与DNMT3L参与睾丸和卵巢生殖细胞肿瘤不同发生过程相关;而DNMT3L在原始生殖细胞肿瘤中的高表达也提示DNA甲基化可能通过改变OCT4及SALL4等干细胞标志物的甲基化状态调控其表达,从而参与原始生殖细胞肿瘤的发生发展。

综上,本研究应用免疫组织化学染色,检测DNMT3L在卵巢恶性生殖细胞肿瘤中的表达,结果表明DNMT3L能够很好地区分卵巢原始生殖细胞肿瘤及非生殖细胞肿瘤,具有较好的敏感性和特异性, DNA甲基化过程在原始生殖细胞肿瘤的发生、发展过程中起至关重要的作用,可能通过调控相关干细胞标志物参与肿瘤的发生、发展机制。

参考文献

- Gershenson DM. Management of ovarian germ cell tumors[J]. *J Clin Oncol*, 2007, 25(20): 2938-2943.
- Nogales FF, Dulcey I, Preda O. Germ cell tumors of the ovary: an update[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2014, 138(3): 351-362.
- Low JJ, Ilancheran A, Ng JS. Malignant ovarian germ-cell tumours[J]. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*, 2012, 26(3): 347-355.
- Chedin F, Lieber MR, Hsieh CL. The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(26): 16916-16921.
- Takashima S, Takehashi M, Lee J, et al. Abnormal DNA methyltransferase expression in mouse germline stem cells results in spermatogenic defects[J]. *Biol Reprod*, 2009, 81(1): 155-164.
- Minami K, Chano T, Kawakami T, et al. DNMT3L is a novel marker and is essential for the growth of human embryonal carcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(10): 2751-2759.
- Miettinen M, Wang Z, McCue PA, et al. SALL4 expression in germ cell and non-germ cell tumors: a systematic immunohistochemical study of 3215 cases[J]. *Am J Surg Pathol*, 2014, 38(3): 410-420.
- 高启云. 生殖细胞核因子在恶性生殖细胞肿瘤中的表达[D]. 石河子: 石河子大学, 2009.
- GAO Qiyun. Expression of germ cell nuclear factor in malignant germ cell tumors[D]. Shihezi: Shihezi University, 2009.
- 王菊, 王海燕, 周宗瑶. Oct-4在精原干细胞定向诱导分化中甲基化的研究[J]. *农垦医学*, 2013, 35(2): 97-100.
- WANG Ju, WANG Haiyan, ZHOU Zongyao. Methylation of Oct-4

- gene in the spermatogonial stem cells of mouse during differentiation in vitro[J]. *Agricultural Reclamation Medicine*, 2013, 35(2): 97-100.
10. 熊俊. 5-羟甲基胞嘧啶结合蛋白的鉴定及其对DNA去甲基化的调控[D]. 北京: 北京协和医学院, 2014.
XIONG Jun. Identification of 5-hydroxymethyl cytosine binding protein and its regulation on DNA demethylation[D]. Beijing: Peking Union Medical College Hospital, 2014.
 11. Uysal F, Akkoyunlu G, Ozturk S. DNA methyltransferases exhibit dynamic expression during spermatogenesis[J]. *Reprod Biomed Online*, 2016, 33(6): 690-702.
 12. 李理, 陈杰. DNA甲基化与肿瘤[J]. *癌症*, 2001, 20(9): 1001-1004.
LI Li, CHEN Jie. DNA methylation and tumor[J]. *Chinese Journal of Cancer*, 2001, 20(9): 1001-1004.
 13. Shovlin TC, Bourc'his D, La Salle S, et al. Sex-specific promoters regulate Dnmt3L expression in mouse germ cells[J]. *Hum Reprod*, 2007, 22(2): 457-467.
 14. Hata K, Okano M, Lei H, et al. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice[J]. *Development*, 2002, 129(8): 1983-1993.
 15. Bourc'his D, Xu GL, Lin CS, et al. Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints[J]. *Science*, 2001, 294(5551): 2536-2539.
 16. Bourc'his D, Bestor TH. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L[J]. *Nature*, 2004, 431(7004): 96-99.
 17. Heo J, Lim J, Lee S, et al. Sirt1 Regulates DNA methylation and differentiation potential of embryonic stem cells by antagonizing Dnmt3l[J]. *Cell Rep*, 2017, 18(8): 1930-1945.

本文引用: 丁晓燕, 张采欣, 周磊, 孔庆暖. DNMT3L在卵巢恶性生殖细胞肿瘤中的表达及其临床病理特征[J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(8): 1608-1613. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.08.003

Cite this article as: DING Xiaoyan, ZHANG Caixin, ZHOU Lei, KONG Qingnuan. Expression of DNMT3L in ovarian germ cell tumors and its clinicopathological features[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2018, 38(8): 1608-1613. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.08.003