

南方医科大学

---

硕士学位论文

---

HOXA10、PTEN基因启动子甲基化与子宫内膜异位症相关性研究

---

姓名：熊美丽

---

申请学位级别：硕士

---

专业：妇产科学

---

指导教师：宗利丽

---

20090407

# HOXA10、PTEN 基因启动子甲基化与 子宫内膜异位症相关性研究

硕士研究生：熊美丽

指导教师：宗利丽 副教授

## 摘 要

### 研究背景

子宫内膜异位症 (Endometriosis, 简称内异症或 EMs) 是妇科常见的一种良性疾病, 它所引起的慢性盆腔疼痛、痛经和不育严重影响了妇女健康和生活质量。由于病变广泛、形态多样, 有转移、浸润和复发等恶性生物学行为, 并且确实能发生恶变, 多恶变为卵巢癌, 所以内异症被形象地称为“良性癌”和妇女盆腔“沙尘暴”。目前其发病机制尚未清楚, 越来越多的研究认为类似恶性肿瘤的生物学行为可能是其重要的发病机制之一, 而恶性病变的发生、发展是以抑癌基因和癌基因遗传变异的积累为标志的, 故内异症的起源与发展亦可能与此遗传变异相关, 尤其是抑癌基因的异常甲基化, 大量的研究已经证实: 抑癌基因非甲基化的 CpG 岛异常甲基化与人类恶性肿瘤的发生、转移密切相关。在大多数正常情况下, 抑癌基因的启动子区 5' CpG 岛是处于非甲基化状态, CpG 岛高甲基化可以使抑癌基因失活, 转录抑制, 导致其表达下降, 最终促使肿瘤的发生。

有研究报道在多种肿瘤中, HOXA10 基因的表达下降, HOXA10 基因可抑制肿瘤细胞增殖, 降低侵袭能力, 抑制肿瘤细胞的转移。提示 HOXA10 基因可能是一种新的候选抑癌基因, PTEN 基因作为一种普遍公认的抑癌基因, 已经被证实在多种肿瘤中起重要作用, 包括脑、卵巢、子宫内膜、前列腺、乳腺、甲状腺、肝、肺和头颈部癌以及淋巴瘤, 特别是在卵巢子宫内膜样癌、子宫内膜

癌和胶质瘤中起重要作用。与其他抑癌基因引起肿瘤的发病机制类似, HOXA10 与 PTEN 基因启动子区 5' CpG 岛高甲基化可能是引起肿瘤发生与发展的重要机制之一。并且有研究认为, HOXA10 与 PTEN 基因启动子区域 5' CpG 岛甲基化异常与卵巢癌、子宫内膜癌等多种恶性肿瘤的发生发展密切相关。内异症作为一种良性性质恶性行为的疾病, 且与卵巢癌关系密切, 它的 PTEN 与 HOXA10 基因是否也存在高甲基化呢? 甲基化是否在其发病中也起重要作用呢? 目前尚不清楚, 国内外这方面研究甚少, 特别是 PTEN 基因甲基化在内异症的作用, 国内外尚未见报道。

## 目的

本研究通过检测内异症患者在位、异位内膜组织及非内异症妇女子宫内膜组织中 HOXA10、PTEN 基因启动子区 5' CpG 岛甲基化状况, 探讨它们在内异症发生发展中的作用, 为进一步探索内异症的发病机制提供新的研究方向, 也为今后深入的研究提供有价值的科研资料。

## 方法

1. 标本来源: 2007 年 9 月—2008 年 7 月期间南方医科大学珠江医院妇产科经腹腔镜证实为内异症患者 30 例为研究组(其中 I~II 期 10 例, III~IV 期 20 例), 获取到患者异位内膜共 30 份、在位内膜 20 份; 同期非内异症的正常妇女 25 例为正常对照组, 取子宫内膜 25 份。

### 2. 实验方法:

(1) 用蛋白酶 K 消化法提取新鲜组织标本基因组 DNA;

(2) 采用甲基化特异性聚合酶链反应 (methylation specific PCR, MSP) 检测所有内膜组织中 HOXA10 与 PTEN 基因启动子区 5' CpG 岛甲基化情况。

采用文献<sup>[28,33]</sup>报道的 HOXA10 与 PTEN 基因启动子区域 5' CpG 岛的引物, 设立实验空白对照。

3. 统计分析: 内异症患者在位、异位内膜组织及正常对照子宫内膜组织三组之间 HOXA10 与 PTEN 基因的甲基化比较采用多个样本率的  $\chi^2$  检验; 两两比较

及III-IV期与 I -II 期内异症患者 HOXA10 与 PTEN 基因的甲基化比较用 Fisher's 确切概率法 (样本总量小于 40 或理论频数小于 5), 多个样本率间的多重比较的检验水准经校正后,  $\alpha'$  为 0.0167 (如以 0.05 为检测水准, 将会加大犯 I 型错误的概率), 其它比较的检验水准  $\alpha$  为 0.05, (统计软件采用 SPSS 13.0)。

## 结果

1. 内异症患者在位、异位内膜组织与正常对照组子宫内膜组织中 HOXA10 基因甲基化比较: 内异症患者 30 份异位内膜组织中检测到 12 份 HOXA10 基因甲基化; 患者 20 份在位内膜组织中检测到 7 份 HOXA10 基因甲基化; 正常对照组子宫内膜组织未检测到 HOXA10 基因甲基化, 三组之间 HOXA10 基因的甲基化比较用多个样本率的卡方检验, 结果显示有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 两两比较显示: 患者在位内膜与正常对照妇女子宫内膜比较无统计学差异; 患者的在位内膜与异位内膜比较无统计学差异; 但患者异位内膜与正常对照妇女子宫内膜比较有统计学差异;

2. 内异症患者在位、异位内膜组织与正常对照组子宫内膜组织中 PTEN 基因甲基化比较: 内异症患者 30 份异位内膜组织中检测到 7 份 PTEN 基因甲基化; 20 份在位内膜组织中检测到 2 份 PTEN 基因甲基化; 正常对照组子宫内膜组织未检测到 PTEN 基因甲基化, 用多个样本率的卡方检验结果显示: 三组比较有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 两两比较显示: 患者在位内膜与正常对照妇女子宫内膜比较无统计学差异; 患者的在位内膜与异位内膜比较无统计学差异; 但患者异位内膜与正常对照妇女子宫内膜比较有统计学差异;

3. 不同期别内异症患者异位内膜组织中 HOXA10 基因甲基化比较: 20 例 III-IV 期内异症患者异位内膜组织中有 11 例 HOXA10 基因发生甲基化; 10 例 I - II 期内异症患者异位内膜组织中有 1 例 HOXA10 基因发生甲基化。Fisher' s 确切概率法分析结果为: III-IV 期内异症患者异位内膜组织与 I - II 期 HOXA10 基因启动子区 5' CpG 岛的甲基化相比较, 差异显著 ( $P < 0.05$ ), 即 III-IV 期内异症患者异位内膜组织中 HOXA10 基因启动子区 5' CpG 岛的甲基化高于 I - II 期;

4. 不同期别内异症患者异位内膜组织中 PTEN 基因启动子区 5' CpG 岛的

甲基化比较：20例III-IV期内异症患者异位内膜组织中有6例PTEN基因发生甲基化；10例I-II期内异症患者异位内膜组织中有1例PTEN基因发生甲基化，Fisher's确切概率法分析结果为：III-IV期内异症患者异位内膜组织与I-II期PTEN基因甲基化比较，差异无显著性（ $P>0.05$ ）。

## 结论

1. HOXA10和PTEN基因启动子区5'CpG岛的高甲基化可能参与了内异症的发病；

2. HOXA10基因甲基化程度与内异症临床分期相关，可能在内异症的进展中起作用；

3. 内异症在位内膜与异位内膜在甲基化方面可能有相似的特性。

**关键词** 内异症 HOXA10 PTEN 基因 甲基化

# **A study on the association of the methylation status of HOXA10 and PTEN gene promoter region with endometriosis**

Name: Xiong Mei-li

Supervisor: Zong Li-li

## **ABSTRACT**

### **Background**

Endometriosis (EMs) is one of the most common benign gynecologic disorders, because it has been linked to pelvic pain, multiple operations, and infertility and difficult to cure. It is well known that certain aspects of endometriosis are similar to those of malignant disease. For example, like cancer, endometriosis can be both locally and distantly metastatic; it attaches to other tissues, invades, and damages them. And it is associated with increasing risk of cancer, The ovary is the most common site for development of malignancy in endometriosis, Nowadays the true mechanism for the pathogenesis or therapy of endometriosis is unclear. More and more evidences have indicated that malignant behavior of cancer has already become important morbidity mechanism of endometriosis. Hereditary variation of oncogene and tumor suppressor genes exists in malignant disease, so does endometriosis, especially the methylation of tumor suppressor genes. A number of studys have indicated that methylation of tumor suppressor genes may play an important role in cancer development and progression. Under the majority normal circumstances, status of tumor suppressor genes doesn't show methylation. Convincing evidences for the significance of CpG island or promoter hypermethylation in tumor development stem from the observation that these events are associated with silencing of tumor suppressor genes ,eventually it causes cancer.

Studies have indicated that HOXA10 gene can decrease invasiveness of cancer

cell. This manifested HOXA10 gene is probably tumor suppressor gene. PTEN gene is a universally accepted tumor suppressor gene, which has been observed in a variety of cancers, such as breast cancer, kidney cancer, bladder cancer, melanoma, glioblastoma, and lung cancer, especially the endometrial, ovarian and glioblastoma cancer. The methylation of the CpG island of HOXA10 and PTEN promoter is important mechanism for the pathogenesis of human neoplasms. And this is often associated with metastatic diseases. Aberrant promoter methylation was related to inactivation of the HOXA10 and PTEN gene in ovarian and endometrial cancer. Endometriosis is a kind of benign disease with malignant behavior, and it's associated with ovarian cancer. And then does hypermethylation of HOXA10 and PTEN genes exist in endometriosis? Does the methylation of the CpG islands of HOXA10 and PTEN promoter play an important role in endometriosis? Now it is not clear. So far, the study about these aspects is eliminated, especially about the methylation of PTEN gene in endometriosis.

### **Objective**

To investigate the methylation status of the 5'CpG island locating in the promoter region of HOXA10 and PTEN gene in endometriotic tissues and uterine endometrium from women with and without endometriosis in order to study the role of HOXA10 and PTEN in the pathogenesis and development of the endometriosis.

### **Methods**

1. Tissue collection: Thirty ectopic endometrium specimens and 20 eutopic endometrium specimens from 30 patients with endometriosis (including 10 cases with endometriosis of stages I - II and 20 cases with endometriosis of stages III-IV) were used as study group from Sep.2007 to July. 2008 in Department of Gynaecology and Obstetrics, Zhujiang Hospital of Southern Medical University, and 25 specimens of endometrium from women without endometriosis were used as controls study in the same period.

#### 2. Methods

(1) Genomic DNA were extracted from frozen specimens by the method of proteinase K digestion.

(2) All samples were detected for the methylation status of the 5'CpG island locating in HOXA10 and PTEN gene promoter region by using methylation-specific PCR technique (MSP).

The primers of the 5'CpG island locating in HOXA10 and PTEN gene promoter region were designed according to reference<sup>[28,33]</sup>. Set up blank control .

(3). Statistical analysis The data were analyzed by using the chi-square test and Fisher's exact test( $n < 40$  or, when any of the expected frequencies was less than 5), Statistical analysis was performed using SPSS 13.0 software.

## Results

1. The comparison of HOXA10 gene methylation between patients with endometriosis and without endometriosis: In women with endometriosis, presence of HOXA10 promoter methylation was seen in 12 of 30 ectopic endometriums, and 7 of 20 eutopic endometriums. However ,there were no methylation occurred in HOXA10 gene of endometrium from 25 women without endometriosis. There were significantly different methylation of HOXA10 gene during three groups( $P < 0.05$ ). There were no significantly different methylation of HOXA10 gene not only between in ectopic endometrium and eutopic endometrium of women with endometriosis, but also in eutopic endometrium of women with endometriosis and endometrium of women without endometriosis, While there were significantly different methylation of HOXA10 gene between ectopic endometrium of women with endometriosis and endometrium of women without endometriosis ;

2. The comparison of PTEN gene methylation between patients with endometriosis and without endometriosis: In women with endometriosis, presence of PTEN gene promoter methylation was seen in 7 of 30 ectopic endometriums, and 2 of 20 eutopic endometriums, .However ,there were no methylation occurred in PTEN gene of endometrium from 25 women without endometriosis. There were significantly different methylation of PTEN gene during three groups( $P < 0.05$ ). There were no significantly different methylation of PTEN gene not only between in ectopic endometrium and eutopic endometrium of women with endometriosis ,but also in eutopic endometrium of women with endometriosis and endometrium of

## ABSTRACT

---

women without endometriosis, While there were significantly different methylation of PTEN gene between ectopic endometrium of women with endometriosis and endometrium of women without endometriosis ;

3. The comparison of HOXA10 gene methylation between patients with endometriosis in I - II stage and III-IV stage: In women with endometriosis, presence of HOXA10 promoter methylation was seen in 11 of 20 ectopic endometriums of patients in III-IVstage ,and1 of 10 patients in I - II stage. There were significantly different methylation of HOXA10 gene in ectopic endometrium between two group patients with endometriosis ( in I - II stage and III-IV stage)( $P < 0.05$ );

4. The comparison of PTEN gene methylation between patients with endometriosis in I - II stage and III-IV stage: In women with endometriosis, presence of PTEN promoter methylation was seen in 6 of 20 ectopic endometriums of patients in III-IVstage ,and1 of 10 patients in I - II stage..There were no significantly different methylation of PTEN gene in ectopic endometrium between two group patients with endometriosis ( in I - II stage and III-IV stage) ( $P > 0.05$ ).

### **Conclusion**

1. The methylation of 5'CpG island in the promoter region of HOXA10 and PTEN gene may be involved in occurrence of endometriosis;

2. The methylation of 5'CpG island in the promoter region of HOXA10 gene may be correlated with the clinical stage of endometriosis and possibly play an important role in the development of endometriosis;

3. There may be same biological characteristics about methylation between ectopic endometrium and eutopic endometrium in women with endometriosis.

**KEYWORDS** Endometriosis; HOXA10; PTEN; Gene; Methylation

## 南方医科大学

### 学位论文原创性声明

本人郑重声明:所呈交的论文是本人在导师的指导下独立进行研究所取得的研究成果。除了文中特别加以标注引用的内容外,本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写的成果作品。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体,均已在文中以明确方式标明。除与外单位合作项目将予以明确方式规定外,本研究已发表与未发表成果的知识产权均归属南方医科大学。

本人承诺承担本声明的法律效果。

作者签名:  日期: 09年4月10日

### 学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定,同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版,允许论文被查阅和借阅。本人授权南方医科大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索,可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

本学位论文属于(请在以下相应方框内打“√”):

- 1、保密□,在\_\_\_年解密后适用本授权书。
- 2、不保密□。

作者签名:  日期: 09年4月10日  
导师签名:  日期: 09年4月10日

## 前 言

子宫内膜异位症(endometriosis,EMs)是指具有活性的子宫内膜组织(腺体和间质)出现在子宫内层以外部位,简称内异症,是育龄妇女的多发病和常见病。近年本病发病率呈明显上升趋势,国内统计,在妇科剖腹手术中,内异症的发病率逐年增长,已达20.1%<sup>[1]</sup>。国外报道,剖腹和腹腔镜手术中患有内异症的病人也达25%以上<sup>[2]</sup>,而且越来越多的学者认为,内异症是导致妇女不孕的主要原因之一。文献报道,在患有不孕症和盆腔疼痛的病人中,77%~82%以上是内异症所致<sup>[3]</sup>。目前,内异症还没有理想的治疗手段,所谓根治性手术需切除双侧卵巢,这对生育年龄妇女无疑是一个严重的身体和精神摧残。药物治疗普遍存在不彻底性、价格昂贵和副作用大等缺点。姑息手术的术后复发成为主要棘手问题,其中切除子宫者复发率为24.1%;保留子宫者复发率高达57.1%<sup>[1]</sup>。故内异症虽属为良性疾病,却影响了妇女的身体健康、生活质量和家庭稳定。因此,明确内异症的病因,研究理想的治疗手段,是亟待解决的问题。到目前为止,内异症真正的发病原因和发病机制尚不清楚。Sampson的经血逆流种植学说<sup>[4]</sup>是公认的内异症重要的病因学说,但它不能解释盆腔外内异症的发生,如胸部、鼻腔等处的发病机理,也无法解释90%生育年龄妇女有经血逆流,而只有10%-15%发病,与内异症发生并无完全相关性,说明可能只是诱因。现在关于内异症发病机理的研究已经涉及到免疫学、遗传学、肿瘤生物学和环境科学等各个领域<sup>[5-12]</sup>。近年来对肿瘤生物学在内异症作用的研究已日益重视,认为异位内膜的转移、种植、生长等类似肿瘤的生物学行为才是内异症发病关键<sup>[13]</sup>,因为内异症与肿瘤在许多方面具有相似性。

内异症是一种良性疾病,却具有恶性病变的特性,比如它能够不断地浸润周围组织,能够转移种植。这不得不使人联想到它与恶性肿瘤之间是否存在某种联系。尽管某些学者对内异症与恶性肿瘤之间的联系执否定态度,个别人认为轻度的内异症也许是所有妇女在生育期的一种生理现象,仅有少部分发展成进行性、破坏性的疾病。但人们以往发现的大量证据可以证明内异症有着明显恶

性倾向，并带有一定的遗传性：①有些内异症与卵巢肿瘤十分类似，尤其是子宫内膜样的亚型；②内异症的腺上皮呈现非典型增生的细胞学改变，这常见于其他器官的恶性病变，与非整倍体 DNA 有关<sup>[14]</sup>；③内异症患者的直系亲戚的患病风险性较高，而且一旦患病，其严重程度都比较重，这暗示着内异症具有先天遗传倾向<sup>[15]</sup>。这些均表明内异症具有一定的肿瘤倾向，并且现认为内异症确实能发生恶变，恶变率约有 0.6%-1.0%<sup>[16]</sup>，内异症大多数恶变为卵巢癌，并增加卵巢癌发病的风险性，Brinton 等<sup>[17]</sup>调查了 1969-1983 年的 20686 例内异症患者，结果显示：平均随诊 11.4 年，卵巢癌的相对危险性是 1.9，随诊>10 年者，卵巢癌的风险上升 2.5 倍。恶变组织类型主要是子宫内膜样癌和透明细胞癌<sup>[18]</sup>，在国外，1996 年 Jiang 等<sup>[19]</sup>研究亦发现卵巢子宫内膜异位病灶主要恶变为卵巢子宫内膜样癌或卵巢透明细胞癌，这表明内异症与卵巢恶性肿瘤是有一定的关系，也提示内异症的发病及恶变机制可能与恶性肿瘤有相同之处。肿瘤的发生是一个多阶段多分子共同作用的结果，其中甲基化导致基因表达变化是肿瘤形成的重要原因。大量研究已证明了此点。DNA 甲基化作为表观遗传学说的组成部分，与肿瘤关系的研究已经成为当前分子生物学的热点之一。DNA 甲基化是目前唯一已知的 DNA 天然修饰方式，即指生物体在 DNA 甲基转移酶 (DNAmethyltransferase, DNMTs) 的催化下，以 S-腺苷蛋氨酸为甲基供体，将胞嘧啶(C)变为 5-甲基胞嘧啶(5-mc)的一种反应。人类基因组的甲基化多发生在 CpG 岛上，CpG 岛是位于基因 5'端调控区(启动子、外显子)，约 200-2000bp 大小，富含 CG 序列的 DNA 片段。一般来说，DNA 甲基化是在基因转录水平调控抑制相关基因的表达。DNA 甲基化异常与肿瘤的发生密切相关，它主要表现为抑癌基因高甲基化所致的基因失活和原癌基因低甲基化所致的基因激活，从而与细胞增殖、分化相关基因的表达异常，造成细胞恶变，形成肿瘤<sup>[20-22]</sup>。HOXA10、PTEN 基因作为两种重要的抑癌基因，研究发现在恶性肿瘤的发生发展中起重要作用，特别是与妇科肿瘤的发生发展关系密切。

HOXA10 基因是同源盒基因家族中的一员，该基因染色体定位于 7p15-p14，全长 3.71kb。其 5'启动子区域富含 CpG 位点 (CpG 岛)，有研究报道在多种肿

瘤中，HOXA10 基因的表达下降，HOXA10 基因可抑制肿瘤细胞增殖，降低侵袭能力，抑制肿瘤细胞的转移<sup>[23-25]</sup>。提示 HOXA10 基因很可能是一种新的候选抑癌基因，Yoshida 等<sup>[25]</sup>为了探讨子宫内膜癌与 HOXA10 基因表达异常的关系，应用组织微阵列和免疫组织化学分析 10 例正常子宫内膜和 10 例 I 期、26 例 II 期、37 例 III 期子宫内膜样癌及 30 例子宫乳头状浆液性腺癌患者子宫内膜组织中 HOXA10 基因的表达情况，结果发现：10 例正常子宫内膜组织中的 HOXA10 基因均显示强表达，I、II 期子宫内膜样癌中的 HOXA10 基因表达明显低于正常子宫内膜，III 期子宫内膜样癌及子宫乳头状浆液性腺癌中 HOXA10 基因表达缺失，Chu 等<sup>[26]</sup>在乳腺癌中同样也发现 HOXA10 基因表达下调，并认为其表达下调可抑制肿瘤增殖、浸润及转移。这符合抑癌基因的表达在肿瘤中表现为下降的原理，抑癌基因表达下降的主要机制之一是由于其启动子区 5' CpG 岛发生高甲基化，同理，HOXA10 基因表达下降很可能是由于其启动子区 5' CpG 岛的高甲基化引起，从而促使肿瘤的发生。Yoshida 等<sup>[25]</sup>在检测子宫内膜癌中 HOXA10 基因表达情况的同时，用甲基化特异性 PCR 法分析子宫内膜癌中 HOXA10 基因甲基化状况，发现子宫内膜癌中 HOXA10 基因启动子区发生高甲基化，随着分期的增高，甲基化程度增高，并认为 HOXA10 基因表达下降与 HOXA10 基因启动子甲基化有关。最近研究发现<sup>[27-28]</sup>，在类似于恶性病变的内异症中，发现 HOXA10 基因表达下降，国外有少量研究在检测内异症中 HOXA10 基因表达状况的同时并研究了其表达异常与甲基化的关系，结果报道，内异症中 HOXA10 基因表达下降可能是由于其启动子区域高甲基化引起的。Taylor 等<sup>[27]</sup>发现，内异症患者在内膜 HOXA10 基因的表达较对照组表达下调。Wu 等<sup>[28]</sup>对内异症患者 HOXA10 基因的表观遗传表型做了进一步的研究，收集 6 例经腹腔镜手术证实为内异症（r-AFS: 3~4 期）患者的在位子宫内膜和 4 例因行输卵管结扎经腹腔镜排除内异症的对照者在位内膜，用甲基化特异性 PCR 技术（Methylation-specific PCR, MSP）和亚硫酸盐测序的方法，检测了 HOXA10 基因启动子 2 个区域中的 3 个片段的甲基化模式，同时提取组织中的 RNA，用实时定量 RT-PCR 检测 HOXA10 基因的表达水平。发现在所有 3 个片段序列中，

病例组较对照组 CpG 岛位点呈高度甲基化状态，且这种异常甲基化模式具有统计学意义。RT-PCR 检测出 HOXA10 基因的表达在内异症患者中下降，与 Taylor 等<sup>[27]</sup>的研究结果一致。启动子区域的高度甲基化可以导致基因表达的沉默，进而认为，这种异常的甲基化模式可能是导致内异症患者 HOXA10 基因表达下调的原因，HOXA10 基因的高甲基化可能与内异症的发生发展密切相关。

PTEN/MMAC1/TEP1，第十染色体同源丢失性磷酸酶一张力蛋白基因 (phosphatase and tension homology deleted on chromosome ten, PTEN)是目前公认的一种肿瘤抑制基因，是 1997 年所发现的第 1 个具有编码磷酸酶活性的抑癌基因<sup>[29]</sup>。定位于第 10 号染色体上 10q23.3 区，全长为 200kb，有 9 个外显子，8 个内含子，PTEN 基因在胞核、核膜和核内都有表达。PTEN 基因的 5'端非翻译区很长，含多个 CGG 重复序列，为甲基化提供基础。PTEN 基因表达异常及甲基化与多种肿瘤的发生、发展密切相关<sup>[30]</sup>。有关该基因在各种肿瘤中的研究已迅速开展，该基因异常在人类许多种癌中已被证实，包括脑、卵巢、子宫内膜、前列腺、乳腺、甲状腺、肝、肺和头颈部癌以及淋巴瘤，特别是在卵巢子宫内膜样癌、子宫内膜癌和胶质瘤中较常见。Salvesen 等<sup>[31]</sup>为证实肿瘤抑制基因 PTEN 基因甲基化是该基因失活的重要机制，研究了 138 例子宫内膜癌患者中 PTEN 基因甲基化状态，其中 26 例存在 PTEN 基因启动子甲基化(19%)，发现甲基化与肿瘤转移存在显著相关，因此认为子宫内膜癌中普遍存在 PTEN 基因甲基化，肿瘤抑制基因甲基化与子宫内膜癌晚期肿瘤转移有关，在肿瘤进展中起重要作用。2006 年，K.F.Tam 等<sup>[32]</sup>对比良性、交界性、恶性卵巢肿瘤中 9 个抑癌基因甲基化状况以探讨 DNA 甲基化与卵巢肿瘤的关系，其中包括 PTEN 基因，分别检测了 89 例卵巢癌、16 例交界性卵巢肿瘤、19 例良性卵巢肿瘤、16 例正常卵巢组织、5 株卵巢癌细胞株中 9 个抑癌基因启动子 CpG 的甲基化状况，结果发现它们对应的甲基化率分别为 28.8%、20.1%、10.5%、11.8%、42.2%，从而认为交界性卵巢肿瘤、卵巢癌的甲基化率明显高于良性卵巢肿瘤与正常卵巢组织。基于内异症与卵巢癌之间存在的相关性，所以国内外已有学者采用聚合酶链反应(PCR)和单链构象多肽(SSCP)等方法检测内异症中 PTEN 的异常改变，

并发现在内异症中 PTEN 基因表达下降,但目前国内外尚未见 PTEN 基因甲基化在内异症作用的研究。

目前研究 DNA 甲基化有多种检测方法,甲基化特异性的 PCR (MSP)<sup>[33-34]</sup>,较为常用。MSP 能够方便可靠的检测特定位点的 DNA 甲基化状态,能够检测至少 0.1%的甲基化模板,这意味着,在含有 0.1 的甲基化模板和 99.9%的未甲基化模板的样品中,在用 MSP 检测时将表现为甲基化阳性。其基本原理是亚硫酸氢盐能将 DNA 上的 C 碱基变成 U 碱基,但若 C 碱基已经发生甲基化,这一转变则不能发生。依据这一差别,设计针对特定位点的、分别与已转变或未转变的 C 碱基配对的 PCR 引物,进行 PCR 反应,检查 PCR 反应产物,即可判断研究位点的甲基化状态。MSP 有以下优点:仅需少量 DNA 模板,简便快速;无须使用昂贵的测序试剂和放射性物质;MSP 中设计的引物既能识别甲基化、又能识别非甲基化位点;且检测的灵敏度高,并且还避免了原来由限制酶区分甲基化和非甲基化的 DNA 的 PCR 方法所引起的假阳性。因此 MSP 是检测甲基化位点的理想方法。

总而言之,上述两基因的研究主要集中在恶性肿瘤方面,它们与内异症二者关系的研究尚处于探索阶段。目前,HOXA10基因甲基化研究较少,PTEN基因甲基化与恶性肿瘤的关系研究较多,但其甲基化与内异症关系方面的研究国内外尚未见报道,本实验采用甲基化特异性聚合酶链反应(MSP)检测内异症患者原位、异位内膜组织及正常子宫内膜组织中HOXA10、PTEN基因启动子区5' CpG岛甲基化,并比较它们在内异症不同临床分期中的差异,旨在探讨上述两基因甲基化在内异症发生发展中的作用。

## 一 材料与amp;方法

### (一) 材料

#### 1. 标本来源

内异症组：选取 2007 年 9 月—2008 年 7 月期间南方医科大学珠江医院妇产科行腹腔镜或开腹手术的内异症患者 30 例作为病例组，年龄 24~48 岁，平均 35 岁，取典型异位内膜 30 份，并刮取在位子宫内膜 20 份，按照修正的 AFS 分期法将 30 例内异症患者分期，其中 I~II 期 10 例，III~IV 期 20 例。

对照组：另选取同期内行绝育手术的正常妇女，或患良性病变需手术的患者作为对照组，均排除患有内异症，共 25 例，年龄 28~49 岁，平均年龄 37 岁，与病例组年龄相比无统计学差异，刮取子宫内膜 25 份。

所有患者术前 3 个月均未接受放疗、化疗或激素治疗，所有诊断均经病理学检查证实。

#### 2. 试剂

- (1). 组织DNA提取试剂盒为广州市铂尔生物科技开发有限公司产品；
- (2). Wizard DNA纯化试剂盒为Promega公司产品；
- (3). 亚硫酸氢钠与对苯二酚为广州杰特伟生物科技有限公司产品；
- (4). 甲基化与非甲基化引物为广州杰特伟生物科技有限公司合成；
- (5). Premix Ex热启动Taq酶TaKaRa公司产品；
- (6). Sss I 甲基转移酶为美国NEB公司产品。

#### 3. 常用仪器设备

- (1). MFPTL-200 PCR 扩增仪      西安天隆科技有限公司；
- (2). 紫外分光光度仪      北京六一仪器厂；
- (3). 凝胶成像系统      北京东方仪器厂；
- (4). 恒温水浴锅      宁波市天恒仪器厂；
- (5). 高速台式离心机      上海医用分析仪器厂；
- (6). DY-A 电泳仪      上海生化所申华生生技术开发公司。

## (二) 方法

1. 基因组 DNA 的提取，参照组织 DNA 提取试剂盒说明进行。

(1) 将组织块加液氮迅速研磨至细粉状，取研磨好的组织于 1.5ml 离心管中，加入 200ul Tissue lysis buffer，然后用 1ml 枪头吹打均匀。也可以将组织直接加入 200ul Tissue lysis buffer，用组织捣碎至糊状。

(2)加入 40ul Proteinase K 和 20ul RnaseA 溶液，立即混匀，55℃温浴 1h 至组织完全消化（期间来回颠倒离心管数次以混匀）。若 55℃温浴 1h 组织仍未消化完全，可延长温育时间。

(3)加入 200ul Binding buffer，迅速振荡混匀，置 72℃温浴 10 分钟后，于 12000rpm 离心 2 分钟，将上清转至另外一个离心管中，注意不能吸收进沉淀，否则会堵塞吸附柱。

(4)加入 100ul 异丙醇，混匀，将混合液转移到一个已经套入收集管的吸附柱内，于 12000rpm 离心 2 分钟，（若柱内留有残余溶液，可延长离心时间），弃去收集管中的废液，将吸附柱放入同一收集管中。（注意：加入异丙醇混匀后，移至吸附柱中之前，不能离心。）

(5)加入 500ulWB1，于 12000rpm 离心 30 秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放入同一收集管中。

(6)加入 500ulWB2，于 12000rpm 离心 30 秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱放入同一收集管中。

(7)重复步骤(6)

(8)于 12000rpm 空柱离心 2 分钟。

(9)吸附柱放入一个干净的 1.5ml 离心管中，在吸附柱的膜中央加入 100ul 事先 65℃水浴预热好的 Elution Buffer，室温放置数分钟以确保乙醇完全挥发干净（否则，将影响电泳加样和后续实验操作），于 12000rpm 离心 1 分钟，离心管中所得收集物即为抽提好的组织基因组 DNA，取 15ul 作纯度、完整性及定量分析，其余置-20℃保存备用。

(10)基因组 DNA 的浓度及纯度测定：取适宜 DNA 样品稀释后，紫外分光

光度仪测吸光度(A)值,分别测定 260nm、280nm 波长时的吸光度值(即 A260、A280 值),并计算 DNA 含量和纯度(A260/A280 比值)。

DNA 样品的浓度 (ug/ul) = A260 X 稀释倍数 X 50/1000

DNA 样品的含量=体积 X DNA 样品的浓度

DNA 样品的纯度=A260/A280 (纯 DNA 的 A260/A280 比值范围为 1.8-2.0,如其值低于 1.6,表明样品中有蛋白、酚等污染;如其值大于 2.0,表明有 RNA 等污染。)

(11)基因组 DNA 完整性的检查:通过 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

①10XTBE 贮存液的配制如下:(pH 为 8.0)

Tris	54.0g
硼酸	27.5g
EDTA	37.2g
双蒸水	500ml

②取 50ml10XTBE 贮存液,再用双蒸水稀释至 500ml,即 1XTBE

③配制 1%琼脂糖凝胶:称取 0.5g 琼脂糖 50ml 1XTBE 中,加热溶解,冷却至 65℃左右再加入 4ul 的 EB 替代溶液。

④电泳胶膜两端用透明胶带封固,梳子至于适当位置,将冷却至 65℃左右的琼脂糖溶液慢慢倒在胶膜上,厚度约 3mm,静置,待胶凝固后揭去胶膜两端的透明胶带,放入电泳槽内,倒入适量电泳缓冲液(一般液面高出凝胶 1cm),小心拔出梳子。

⑤将 2-5ug 提取的基因组 DNA 样品,与适量 loading buffer 混匀,加入凝胶点样孔内,防止产生气泡和样品溢出。

⑥将电泳槽通电,80V 恒压电泳 30 分钟。

⑦电泳完毕,关掉电泳仪,倒去电泳槽中的电泳缓冲液,小心取出凝胶置于紫外灯下观察结果,有 DNA 存在的地方显示为亮色条带。

2. 采用甲基化特异性 PCR (methylation specific PCR, MSP) 法检测 HOXA10 与 PTEN 基因启动子区 5'CpG 岛的甲基化。

MSP 原理：如下图所示：

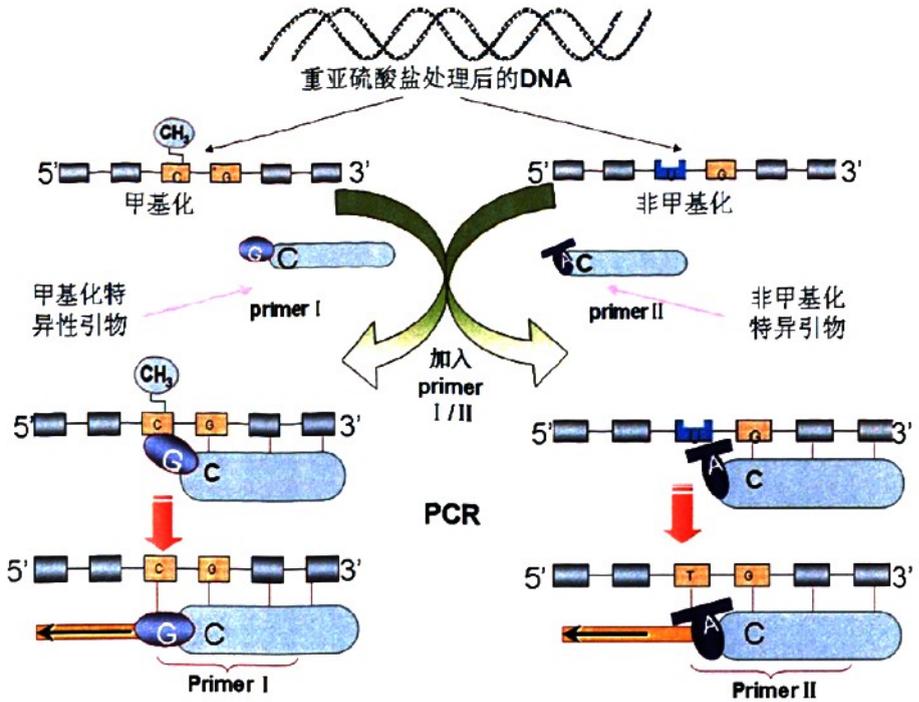


图1 甲基特异性的PCR扩增 (MS-PCR) 示意图

DNA经重亚硫酸盐处理后，以处理后的产物作为模板，加入甲基化特异性的引物（primer I）或非甲基化的引物（primer II），进行特异性的扩增，只有结合完全的甲基化或非甲基化特异性引物的片段才能扩增出产物。

Fig. 1 The principle of methylation-specific PCR technique (MSP)

具体步骤:

(1) DNA 的亚硫酸氢盐修饰

1) 3mol/L NaOH 的配制: 称 1.2gNaOH 加入 10ml 的双蒸水中, 不停地搅拌;

2) 取 1~2μg 基因组 DNA 于 1.5mlEP 管中使用双蒸水稀释至 50ul;

3) 加 5.5μl 新鲜配制的 3mol/L NaOH;

4) 42℃水浴变性 30min;

水浴期间配制: ①3.6mmol/L 亚硫酸氢钠: 称 3.76g 亚硫酸氢钠放入 8ml 的双蒸水中, 不停地搅拌, 并调 PH 值, 使 PH 值为 5.0, 最后定容为 10ml; ② 10mmol/L 对苯二酚: 称 55mg 对苯二酚加入 50ml 的双蒸水中, 不停地搅拌。(两种试剂均应注意用铝箔纸避光)

5) 再加入 520μl 新鲜配制的 3.6mol/L 亚硫酸氢钠 (pH5.0) 与 10mmol/L 对苯二酚 30μl 轻轻混合, 铝箔纸裹, 轻柔颠倒(避光);

6) 再加入 200μl 石蜡油封层;

7) 52℃保温 16h。

(2) 修饰后 DNA 纯化回收

1) 将移液器枪头伸入石蜡油层下, 先把液体表面的石蜡油吸出, 然后吸取混合液至一洁净 1.5mlEP 管中。

2) 70℃水浴预热双蒸水; 配制 80%异丙醇;

3) 加 1ml Promega' s Wizard DNA Clean-up resin 至混合液中, 轻柔颠倒混匀, 使 DNA 充分与树脂结合;

4) 将注射器针筒与试剂盒提供的回收小柱紧密连接后, 将上述混合物用移液器移至针筒内, 加针栓, 轻轻加压, 将液体挤出, 此时可见小柱内有白色的树脂沉积。(注: 需要自备 3ml-5ml 注射器。)

5) 将注射器与小柱分离后拔出针栓, 再将针筒与小柱连接, 向针筒内加入 2ml 80%的异丙醇, 插入针栓, 轻轻加压, 将异丙醇挤出。此为洗涤步骤。

6) 将注射器与小柱分离, 将小柱置于洁净 1.5ml 洁净 EP 管上, 离心 12000rpm,

2min, 以甩去残余异丙醇成分, 使树脂干燥。此时, 修饰后 DNA 处于与树脂结合状态。

7) 将小柱取下置于另一洁净 1.5mlEP 管上, 移液器加 50ul 预热好的双蒸水, 室温放置 5min。

8) 离心 12000rpm, 20s, 此为洗脱步骤, 此时 EP 管内液体即为洗脱的修饰后 DNA 溶液, 终体积为 50ul。

9) 加 5.5ul 新鲜配制的 3mmol/L NaOH, 室温放置 15min。

10) 加 33ul 的 10mmol/L 乙酸铵, 以中和 NaOH。

11) 加 4ul 10mg/ml 糖原, 此作为沉淀指示剂, 因为其与乙醇混合后可产生沉淀, 便于以后离心后辨别回收物的位置, 以防在吸取残余乙醇时将回收物吸走。

12) 加 270ul 冰无水乙醇, 置于-20℃, 过夜沉淀。

13) 4℃, 12000rpm 离心, 30min, 倒去上清液, 收集沉淀。不必吸净。

14) 加 500ul 70%乙醇, 不要将沉淀吹打起来, 只要把乙醇加上即可。轻柔倾斜 EP 管, 旋转一圈, 再次离心, 4℃12000rpm, 5min。离心后倒掉上清, 再加同量乙醇, 同样再做一遍。此为洗涤步骤, 共 2 次。

15) 倒掉上清, 并常温简短离心后, 将附壁乙醇离至 EP 管底, 移液器小心将残余液体吸净, 室温干燥 5min, 或沉淀由不透明变为半透明或透明时, 加入 50ul 双蒸水 (灭菌双蒸水), 溶解沉淀。至此, 已完成了修饰后 DNA 的纯化回收, 所得为修饰后 DNA 溶液, 可用于此后的进一步实验。

16) -20℃保存 DNA 溶液。

注: 2) 至 8) 用 Promega Wizard Clean up DNA 纯化试剂盒

### (3) 引物设计

HOXA10 基因启动子区域 5' CpG 岛的引物按参考文献<sup>[28]</sup>设计, HOXA10 甲基化 (M) 和非甲基化 (U) 引物预期扩增片段大小均为 143bp, 见表 1; PTEN 基因启动子区域 5' CpG 岛的引物按参考文献<sup>[35]</sup>设计, PTEN 甲基化 (M) 引物预期扩增片段大小为 71bp, PTEN 非甲基化 (U) 引物预期扩增片段大小为 78bp, 见表 2。

表 1 HOXA10 基因启动区域 MSP 分析所用引物

Tab1 The primers designed for HOXA10 in the methylation-specific PCR technique

引物名称	引物序列	产物长度(Size bp)
HOXA10MF	5' -GTTT TTATAGTTTTTCGGTTTTTCGG -3'	143
HOXA10MR	5' -ACTCCCAATTTAATTTTCGTAAA CG-3'	
HOXA10UF	5' -TTTTTATAGTTTTTGGTTTTTGG -3'	143
HOXA10UR	5' -CACTCCCAATTTAATTTTCATAAACAC-3'	

表 2 PTEN 基因启动区域 MSP 分析所用引物

Tab 2 The primers designed for PTEN in the methylation-specific PCR technique

引物名称	引物序列	产物长度(Size bp)
PTENMF	5' -GGCGGCGGTCGCGGTTC-3'	71
PTENMR	5' -GACTCCCCGAAAACGCTAC-3'	
PTENUF	5' -GAGAGATGGTGGTGGTTGT -3'	78
PTENUR	5' -AACTCCCCAAAAACTACC-3'	

(4) 设立对照 将正常健康人外周血淋巴细胞中所提的基因组 DNA 与 S-腺苷甲硫氨酸 (终浓度为 160 $\mu$ mol/L)和 1U Sss I 甲基转移酶共孵育 2h, 再经亚硫酸氢钠修饰作为完全甲基化的阳性对照; 将正常健康人外周血淋巴细胞中所提的基因组 DNA 仅用亚硫酸氢钠处理则作为完全未甲基化阴性对照; 用灭菌去离子水代替 DNA 模板的 PCR 反应体系作为空白对照。

(5) PCR 扩增 第一轮 PCR 反应, 12.5 $\mu$ l 的 PCR 反应体系: 模板 DNA1.5 $\mu$ l, 灭菌去离子水 3.75 $\mu$ l, Premix Ex 热启动 Taq 酶混合液 6.25 $\mu$ l (其中包括 4mmol/L Mg<sup>2+</sup>, 0.4mmol/L dNTPs, 0.3125U Taq 酶), 甲基化 F、R 引物各 0.5 $\mu$ l (5pmol), 非甲基化 F、R 引物各 0.5 $\mu$ l (5pmol) 等。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30s, 60~56 $^{\circ}$ C 退火 1min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 退火温度每降低 1 $^{\circ}$ C, 2 个循环, 直至 56 $^{\circ}$ C 共 10 个循环; 95 $^{\circ}$ C 变性 30s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s, 25 个循环; 末次 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min, 总共 35 个循环。第二轮 PCR 反应, 25 $\mu$ l 的 PCR 反应体系: 用第一轮反应产物稀释 10 倍再取 2 $\mu$  作为模板, 灭菌去离子水 8.5 $\mu$ l, Premix Ex 热启动 Taq 酶混合液 12.5 $\mu$ l (其中包括 4mmol/L Mg<sup>2+</sup>, 0.4mmol/LdNTPs , 0.625UTaq 酶), 甲基化 F、R 引物各 1 $\mu$ l (10pmol), 非甲基

化 F、R 引物各 1 $\mu$ l (10pmol) 等, 反应条件与第一轮相同。

(6) 结果观察 取 9 $\mu$ l PCR 产物于 2%琼脂糖凝胶中电泳, 100V 40min, 于紫外灯下观察并成像。判定标准: HOXA10 基因: 如果甲基化特异性引物 (M) 扩增出 143 bp 条带,非甲基化特异性引物 (U) 未扩增出条带, 说明 HOXA10 基因启动子区 5'Cp G 发生了纯合型甲基化; 反之即未发生甲基化; 若 M、U 均扩增出相应大小的条带, 说明存在杂合型甲基化状态; PTEN 基因: 如果甲基化特异性引物 (M) 扩增出 71 bp 条带, 非甲基化特异性引物 (U) 未扩增出条带, 说明 PTEN 基因启动子区 5'Cp G 发生了纯合型甲基化; 反之即未发生甲基化; 若 M、U 均扩增出相应大小的条带, 说明存在杂合型甲基化状态。见图 2 至图 6。

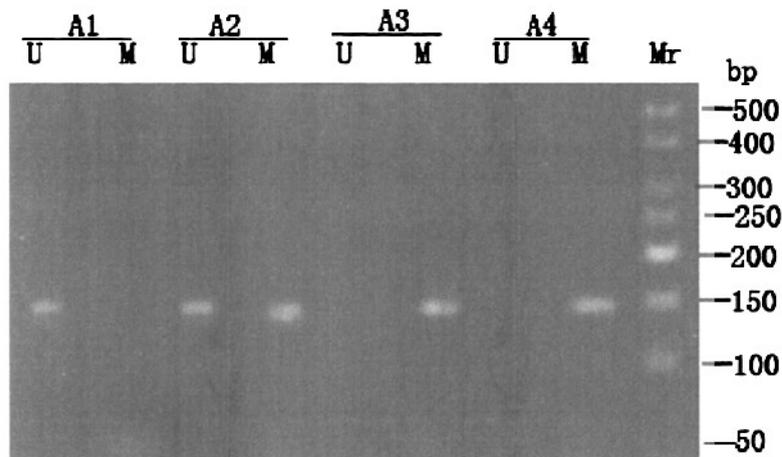


图 2 内异症患者在位内膜组织 HOXA10 基因甲基化检测琼脂糖凝胶电泳图

M. 为甲基化扩增, 甲基化特异性引物扩增出 143bp 的条带; U. 为非甲基化扩增, 非甲基化特异性引物扩增出 143bp 的条带; Mr 为 DNA 标准分子量. 50bp Ladder; A1-A4 为内异症患者位在内膜样本, 其中 A1 为完全非甲基化 (U), A3、A4 为完全甲基化 (M), A2 为部分甲基化 (M)

Fig. 2 Methylation status of HOXA10 by MSP with bisulfite-treated eutopic endometrium tissue samples from endometriosis patients

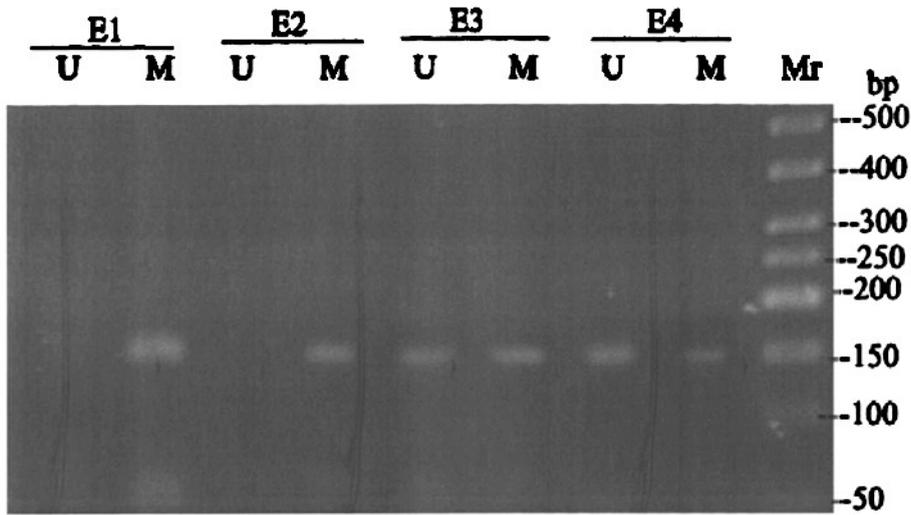


图3 内异症患者异位内膜组织 HOXA10 基因甲基化检测琼脂糖凝胶电泳图  
M. 为甲基化扩增, 甲基化特异性引物扩增出 143bp 的条带; U. 为非甲基化扩增, 非甲基化特异性引物扩增出 143bp 的条带; Mr 为 DNA 标准分子量. 50bp Ladder; E1-E4 为内异症患者异位内膜样本, 其中 E1、E2 为完全甲基化 (M), E3、E4 为部分甲基化 (M)

Fig. 3 Methylation status of HOXA10 by MSP with bisulfite-treated ectopic endometrium tissue samples from endometriosis patients

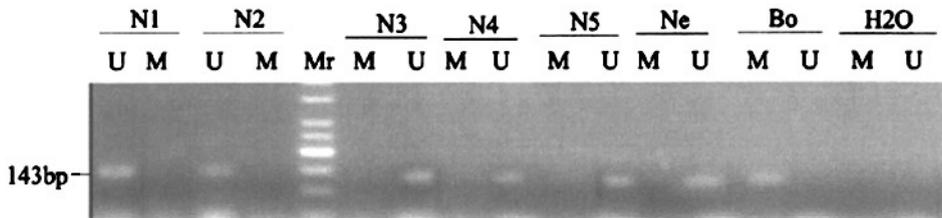


图4 正常对照子宫内膜组织 HOXA10 基因甲基化检测琼脂糖凝胶电泳图  
M. 为甲基化扩增, 甲基化特异性引物扩增出 143bp 的条带; U. 为非甲基化扩增, 非甲基化特异性引物扩增出 143bp 的条带; Mr. 为 DNA 标准分子量. 50bp Ladder; N1-N5 为正常子宫内膜, 均为非甲基化 (U), Ne 为非甲基化阴性对照, Bo 为甲基化阳性对照, H2O 为空白对照

Fig. 4 Methylation status of HOXA10 by MSP with bisulfite-treated endometrial tissue samples from normal controls

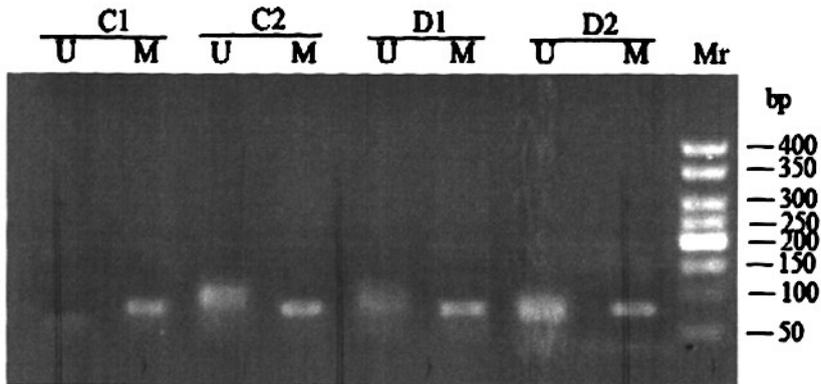


图5 内异症患者位在、异位内膜组织 PTEN 基因甲基化检测琼脂糖凝胶电泳图

M. 为甲基化扩增, 甲基化特异性引物扩增出 71bp 的条带; U. 为非甲基化扩增, 非甲基化特异性引物扩增出 78bp 的条带; Mr 为 DNA 标准分子量. 50bp Ladder; C1-C2 为位在内膜样本, D1-D2 为异位内膜样本, 其中 C1 为完全甲基化 (M), 为 C2、D1、D2 部分甲基化 (M)

Fig.5 Methylation status of PTEN by MSP with bisulfite-treated eutopic and ectopic endometrium tissue samples from endometriosis patients

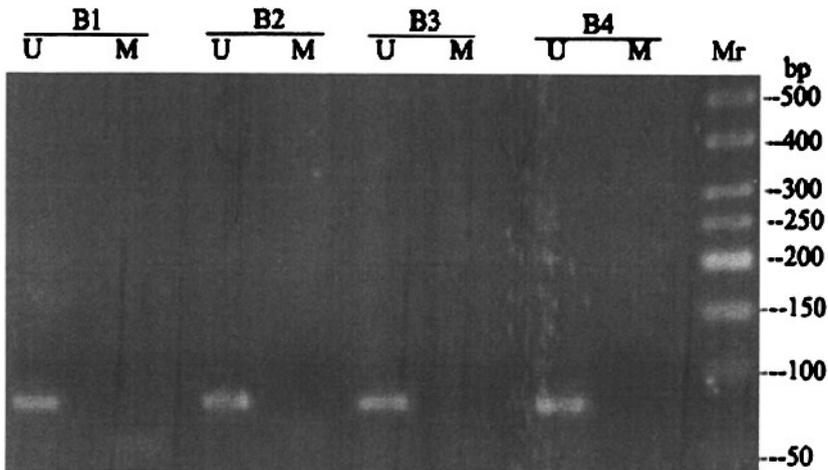


图6 正常对照组子宫内膜组织 PTEN 基因甲基化检测琼脂糖凝胶电泳图

M. 为甲基化扩增, 甲基化特异性引物扩增出 71bp 的条带; U. 为非甲基化扩增, 非甲基化特异性引物扩增出 78bp 的条带; Mr. 为 DNA 标准分子量 50bp Ladder; B1-B4 为正常子宫内膜, 均为非甲基化 (U)

Fig.6 Methylation status of PTEN by MSP with bisulfite-treated endometrial tissue samples from normal controls

3. 统计学处理 内异症患者在位、异位内膜组织及正常对照子宫内膜组织三组之间 HOXA10 与 PTEN 基因的甲基化比较采用多个样本率的  $\chi^2$  检验; 两两比较及 III-IV 期与 I-II 期内异症患者 HOXA10 与 PTEN 基因的甲基化比较用 Fisher's 确切概率法 (样本总量小于 40 或理论频数小于 5), 多个样本率间的多重比较的检验水准经校正后,  $\alpha$  为 0.0167 (如以 0.05 为检测水准, 将会加大犯 I 型错误的概率), 其它比较的检验水准  $\alpha$  为 0.05, (统计软件采用 SPSS 13.0)。

## 二 结果

### (一) 基因组 DNA 的鉴定

本实验提取的 DNA 经紫外分光光度仪测得 A260/A280 比值范围为 1.7~1.9, (见图 7), 表明所提 DNA 纯度高、污染低。所提 DNA 的浓度为 0.14~0.69ug/ul。1%琼脂糖凝胶电泳每个孔道可见一条清晰的 >10kp 大小粗的亮带, 表明 DNA 带完整, 没有降解, 可用做后续实验(见图 8)。

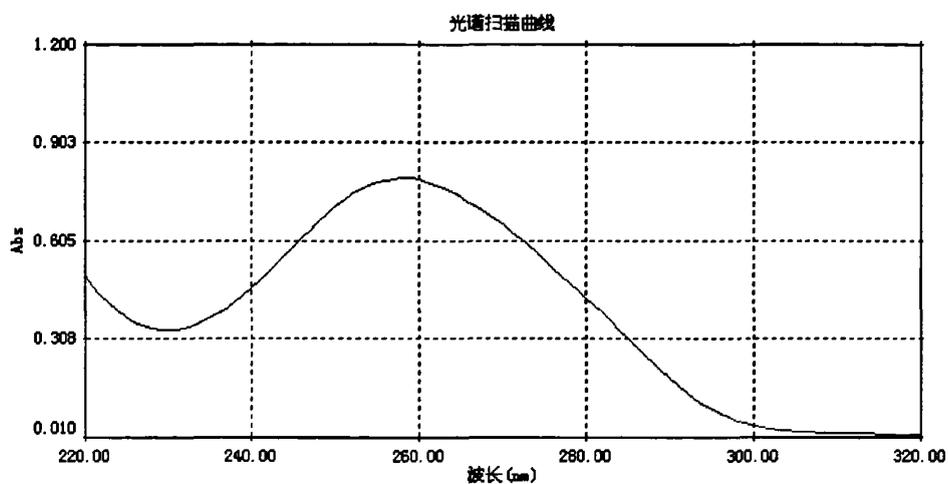


图 7 其中一样本基因组 DNA 的吸光度值 (A)

基因组 DNA 稀释 10 倍后测吸光值(A), 此基因组 DNA 的 A260 为 0.8351nm, A280 为 0.4606nm, A260/A280 比值为 1.8132.

Fig.7 Absorbance value of genomic DNA

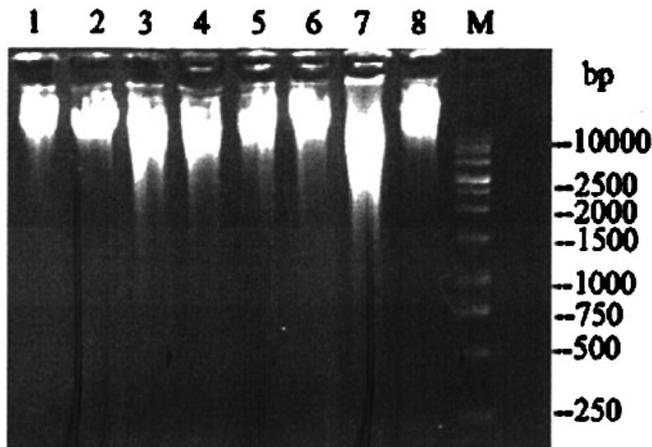


图 8 基因组 DNA 电泳图

1-3 为内异症异位内膜组织；4-6 为内异症异位内膜组织；7-8 为对照组正常子宫内膜组织；M 为 DNA 标准分子量。

Fig.8 Genomic DNA detected by AGE

## (二) 内异症患者在位、异位内膜组织与正常对照组子宫内膜中 HOXA10 基因启动子区 5'CpG 岛的甲基化比较

内异症患者 30 份异位内膜组织中检测到 12 份 HOXA10 基因甲基化；20 份在位内膜组织中检测到 7 例 HOXA10 基因甲基化；正常对照组子宫内膜组织未检测到 HOXA10 基因甲基化。内异症在位、异位内膜组织及正常对照组子宫内膜组织三组 HOXA10 基因的甲基化比较用多个样本率的  $\chi^2$  检验，各组间 HOXA10 基因的甲基化比较用多个样本率间的多重比较(Fisher's 确切概率法)，结果显示：

(1) 内异症患者在位、异位内膜组织及正常子宫内膜组织三组之间 HOXA10 基因的甲基化发生率比较有统计学差异 ( $P < 0.05$ )，见表 3；

表3 内异症患者在位, 异位内膜及正常对照妇女子宫内膜组织中  
HOXA10 基因甲基化模式

Tab 3 The comparison of HOXA10 gene methylation between patients  
with endometriosis and without endometriosis

分 组	甲基化数	非甲基化数	甲基化率
内异症异位内膜组	12	18	40%
正常对照子宫内膜组	0	25	0%
内异症在位内膜组	7	13	35%

多个样本率的  $\chi^2$  检验比较,  $\chi^2 = 12.882$ ,  $P < 0.05$ 。

(2) 内异症患者在位内膜组织与对照组正常子宫内膜组织 HOXA10 基因的甲基化发生率比较, 无统计学差异, 见表 4;

表4 内异症患者在位内膜组织与正常对照妇女子宫内膜组织中 HOXA10 基因甲基化模式

Tab 4 The comparison of HOXA10 gene methylation between  
eutopic endometrium of patients and normal endometrium of control women

分 组	甲基化数	非甲基化数	甲基化率
正常对照子宫内膜组	0	25	0%
内异症在位内膜组	7	13	35%

Fisher' s 确切概率法,  $P = 0.020$ , 检验水准  $\alpha$  为 0.0167。

(3) 内异症患者异位内膜组织与正常对照妇女子宫内膜组织 HOXA10 基因的甲基化发生率比较, 有统计学差异 ( $P < 0.01$ ), 见表 5;

## 结果

表 5 内异症患者异位内膜组织与正常对照妇女子宫内膜组织中 HOXA10 基因甲基化模式  
Tab 5 The comparison of HOXA10 gene methylation between ectopic endometrium of patients and normal endometrium of control women

分 组	甲基化数	非甲基化数	甲基化率
内异症异位内膜组	12	18	40%
正常对照子宫内膜组	0	25	0%

Fisher' s 确切概率法,  $P = 0.000 < 0.01$ , 检验水准  $\alpha'$  为 0.0167。

(4) 内异症患者在位内膜组织与异位内膜组织 HOXA10 基因的甲基化发生率比较无统计学差异, 见表 6。

表 6 内异症患者在位内膜组织与异位内膜子宫内膜组织中 HOXA10 基因甲基化模式  
Tab 6 The comparison of HOXA10 gene methylation between eutopic endometrium of patients and ectopic endometrium of control women

分 组	甲基化数	非甲基化数	甲基化率
内异症异位内膜组	12	18	40%
内异症在位内膜组	7	13	35%

Fisher' s 确切概率法,  $P = 0.774$ , 检验水准  $\alpha'$  为 0.0167。

### (三) 内异症患者在位、位内膜组织与正常对照组子宫内膜中 PTEN 基因启动子区 5' CpG 岛的甲基化比较

1. 内异症患者 30 份异位内膜组织中检测到 7 份 PTEN 基因甲基化; 20 份在位内膜组织中检测到 2 份 PTEN 基因甲基化; 正常对照组子宫内膜组织均未检测到 PTEN 基因甲基化。内异症患者在位、异位内膜组织及正常对照子宫内膜组织三组 PTEN 基因的甲基化比较用多个样本率的卡方检验, 各组间 PTEN 基因的甲基化比较用多个样本率间的多重比较(Fisher' s 确切概率法), 结果显示:

(1) 内异症患者在位、异位内膜组织及正常对照子宫内膜组织三组之间

PTEN 基因的甲基化比较有统计学差异 ( $P < 0.05$ )，见表 1-7；

表 7 内异症患者异位、异位内膜及正常对照子宫内组织 PTEN 基因甲基化模式

Tab 7 The comparison of PTEN gene methylation between patients with endometriosis and without endometriosis

分 组	甲基化数	非甲基化数	甲基化率
内异症异位内膜组	7	23	23.3%
对照正常子宫内组织	0	25	0%
内异症在位内膜组	2	18	10%

多个样本率的  $\chi^2$  检验比较,  $\chi^2 = 9.439$  ,  $P < 0.05$ 。

(2) 内异症患者在位内膜组织与正常对照妇女子宫内组织 PTEN 基因的甲基化发生率比较, 无统计学差异, 见表 8；

表 8 内异症患者在位内膜组织与正常对照妇女子宫内组织 PTEN 基因甲基化模式

Tab 8 The comparison of PTEN gene methylation between eutopic endometrium and normal endometrium

分 组	甲基化数	非甲基化数	甲基化率
对照正常子宫内组织	0	25	0%
内异症在位内膜组	2	18	10%

Fisher' s 确切概率法,  $P = 0.192$ , 检验水准  $\alpha'$  为 0.0167。

(3) 内异症患者异位内膜组织与正常对照组子宫内组织 PTEN 基因的甲基化发生率比较, 无统计学差异, 见表 9；

结果

表 9 内异症患者异位内膜组织与正常对照妇女子宫内膜组织中 PTEN 基因甲基化模式

Tab 9 The comparison of PTEN gene methylation between ectopic endometrium and normal endometrium

分 组	甲基化数	非甲基化数	甲基化率
内异症异位内膜组	7	23	23.3%
对照正常子宫内膜组	0	25	0%

Fisher' s 确切概率法, P=0.012, 检验水准  $\alpha$  为 0.0167。

(4) 内异症患者在位内膜组织与异位内膜组织 PTEN 基因的甲基化发生率比较, 无统计学意义, 见表 10。

表 10 内异症患者在位内膜组织与异位内膜组织中 PTEN 基因甲基化

Tab 10 The comparison of PTEN gene methylation between eutopic endometrium and ectopic endometrium of patients with endometriosis

分 组	甲基化数	非甲基化数	甲基化率
内异症异位内膜组	7	23	23.3%
内异症在位内膜组	2	18	10%

Fisher' s 确切概率法, P=0.285, 检验水准  $\alpha$  为 0.0167。

#### (四) 不同期别内异症患者异位内膜组织中 HOXA10 基因启动子区 5' CpG 岛的甲基化比较

20 例 III-IV 期内异症患者异位内膜组织中有 11 例 HOXA10 基因 PTEN 基因发生甲基化; 10 例 I - II 期内异症患者异位内膜组织中有 1 例 HOXA10 基因发生甲基化。因样本总量小于 40 例所以用 Fisher's 确切概率法分析, 结果为: III-IV 期内异症患者异位内膜组织与 I - II 期 HOXA10 基因启动子区 5' CpG 岛的甲

甲基化发生率相比较，差异显著 ( $P < 0.05$ )，即III-IV期内异症患者异位内膜组织HOXA10基因启动子区5' CpG岛的甲基化发生率高于I-II期。见表11。

表11 不同分期内异症患者异位内膜组织中HOXA10基因甲基化

Tab 11 The comparison of HOXA10 gene methylation between endometrium of patients with endometriosis in I-II stage and III-IV stage

分期	甲基化数	非甲基化数	甲基化率
I—II期	1	9	10%
III—IV期	11	9	55%

Fisher's 确切概率法比较,  $P=0.024 < 0.05$ 。

### (五) 不同期别内异症患者异位内膜组织中PTEN基因启动子区5' CpG岛的甲基化比较

20例III-IV期内异症患者异位内膜组织中有6例PTEN基因发生甲基化；10例I-II期内异症患者异位内膜组织中有1例PTEN基因发生甲基化，因样本总量小于40例所以用Fisher's确切概率法分析，结果为：III-IV期内异症患者异位内膜组织与I-II期PTEN基因甲基化率比较，差异无显著性 ( $P > 0.05$ )。见表12。

表12 不同分期内异症患者异位内膜组织中PTEN基因甲基化模式

Tab 12 The comparison of PTEN gene methylation between endometrium of patients with endometriosis in I-II stage and III-IV stage

分期	甲基化数	非甲基化数	甲基化率
I—II期	1	9	10%
III—IV期	6	14	30%

Fisher's 确切概率法比较,  $P=0.372 > 0.05$ 。

### 三 讨论

DNA 甲基化是为人们所熟知的一种基因表遗传调控过程, 这种改变并不影响 DNA 的碱基序列, 而是对基因组 DNA 进行的可遗传性修饰<sup>[36-37]</sup>。胞嘧啶甲基化是表遗传改变的重要机制之一。在人类及哺乳动物体内, DNA 甲基化是指通过酶催化作用, 以 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)为甲基供体, 将甲基转移到胞嘧啶第五位碳原子上。大多数 5'甲基胞嘧啶以双核苷酸 CpG 的形式出现。CpG 的分布不是随机的, 在基因组的某些区域含有丰富的 CpG 位点, 称为 CpG 岛。CpG 岛一般含有几百到一千个碱基对, 通常位于基因的 5'端启动子区, 也可以延伸到基因的外显子区。人类基因组中约有 45,000 个 CpG 岛。正常情况下,除了印记基因和女性失活的 X 染色体几个基因外, 在 CpG 岛的 CpGs 总是非甲基化的, 而大多数 CpG 岛之外的 CpGs 则是甲基化的。目前, 大量研究已经表明, CpG 岛异常甲基化是存在于肿瘤中的普遍现象。整个肿瘤基因组中癌基因广泛低甲基化和抑癌基因 CpG 岛的高甲基化并存, 是导致多种人类肿瘤中癌基因激活和抑癌基因失活的主要机制。早期的研究认为, 抑癌基因失活在于遗传学上的改变, 包括突变与缺失。但近年来大量的研究表明, 在肿瘤细胞中抑癌基因 5'端 CpG 岛的过度甲基化在多种抑癌基因失活中起主要作用。目前的研究已经发现和抑癌基因甲基化有关的基因沉寂影响细胞的所有途径<sup>[38-39]</sup>: 从细胞周期抑制因子到诱导凋亡; 从 DNA 修复基因到细胞粘附; 从激素受体到细胞解毒。不难看出, 抑癌基因 CpG 岛甲基化直接参与了细胞的恶变过程。内异症具有肿瘤的生物行为, 并且确实能恶变, 与肿瘤的发病机制类似, 即抑癌基因启动子 CpG 岛甲基化可能也参与了内异症的发病及癌变。

引言部分已经阐述 HOXA10 基因很可能是一种新的候选基因, 能抑制肿瘤的发生与转移, 但目前尚存在争议, PTEN 基因作为多肿瘤抑制基因, 在肿瘤中的抑癌作用在人类许多种癌中已被证实, 特别是与卵巢子宫内膜样癌和子宫内膜癌发生、发展关系密切。已有的研究显示, 两基因在肿瘤发生发展作用中的主要机制之一可能是启动子 CpG 岛的高甲基化, Yoshida 等<sup>[25]</sup>研究发现

HOXA10 基因在子宫内膜癌中表达是下调的，并随着病变的进展，表达程度越低，甚至表达缺失，认为 HOXA10 基因能抑制子宫内膜癌的发生及转移，在研究表达低下的基础下还进一步研究了子宫内膜癌中 HOXA10 的甲基化状况，结果发现子宫内膜癌存在高甲基化状态，并发现随着分期的升高，HOXA10 甲基化程度越高，并认为子宫内膜癌中 HOXA10 基因表达下降是由于其发生高甲基化引起的，这与抑癌基因启动子的高甲基化使其表达沉默原理一致，Chu 等<sup>[26]</sup>研究发现乳腺癌中 HOXA10 基因表达下调，并认为其表达下调可抑制肿瘤增殖、浸润及转移，与 Yoshida 等研究观点一致，而 Salvesen 等<sup>[31]</sup>在子宫内膜癌中也现 PTEN 基因发生甲基化，甲基化率为 19%，与对照组有统计学意义，并且认为 PTEN 基因甲基化与肿瘤转移存在显著相关，在子宫内膜癌进展中起重要作用。而 HOXA10 和 PTEN 基因在内异症的作用又是如何呢？尤其是这两基因的甲基化在内异症作用如何呢？目前国内外研究甚少。

Wu 等<sup>[28]</sup>首次对内异症患者在位内膜组织中 HOXA10 基因的甲基化作了研究，结果发现病例组较对照组在位内膜启动子 CpG 岛呈高度甲基化状态，同时发现病例组的 HOXA10 表达低于对照组，并认为这种异常的甲基化模式可能是导致内异症患者 HOXA10 基因表达下调的原因。有关 PTEN 基因甲基化在内异症中的研究，目前，国内外尚未见报道，但有研究在 mRNA 及蛋白水平上对内异症中 PTEN 基因的表达作了检测，并且发现其表达是下调的，李淑娟<sup>[40]</sup>等在研究卵巢子宫内膜异位囊肿和卵巢子宫内膜样癌中 PTEN 蛋白的表达时发现 PTEN 蛋白在卵巢子宫内膜样癌组织中阳性表达明显下降，在正常子宫内膜组织中 PTEN 蛋白为高表达，而 PTEN 蛋白在卵巢子宫内膜异位囊肿组织中的表达介于正常子宫内膜和卵巢子宫内膜样癌之间。并发现在高、中分化卵巢子宫内膜样癌中 PTEN 蛋白表达阳性率明显高于低分化卵巢子宫内膜样癌中 PTEN 蛋白表达阳性率。彭丽秀等<sup>[41]</sup>在 mRNA 水平上研究 PTEN 基因的表达水平也发现 PTEN 基因在内异症中表达是下调的，与蔡知天等<sup>[42]</sup>研究一致。总之，在内异症中存在着 PTEN 基因的失活，研究已经证实 PTEN 在肿瘤中的失活很可能是由于其启动子发生了高甲基化，同理，其在内异症中表现失活很可能也是由于其

启动子高甲基化引起的。

在本实验中，内异症患者 30 份异位内膜组织中有 14 份检测到 HOXA10 基因启动子区域发生甲基化，7 份检测到 PTEN 基因启动子发生甲基化，20 份在位内膜组织中 7 份 HOXA10 基因发生甲基化，2 份 PTEN 基因发生甲基化，而正常对照组子宫内膜组织均未检测到 HOXA10 与 PTEN 基因甲基化，虽然内异症患者在位内膜组织 HOXA10 与 PTEN 甲基化与正常对照子宫内膜组织相比较无统计学差异，似乎可以得出内异症患者在位内膜与正常妇女子宫内膜在甲基化方面无区别的结论，但内异症患者在位内膜组织确实是检测出了 HOXA10 与 PTEN 基因一定的甲基化，而正常对照组子宫内膜组织未检测出一例甲基化，如果扩大例数，很可能会得出有意义的结果，并且内异症患者异位内膜组织与正常对照子宫内膜组织比较是有显著性差异，这些也提示 HOXA10、PTEN 基因启动子区域甲基化在内异症的发病中可能起重要作用。最近研究也发现，内异症动物模型的在位内膜组织中 HOXA10 表达水平明显低于正常对照组，同时检测到病例组在位内膜组织中 HOXA10 基因表现为高甲基化状态，进一步佐证 HOXA10 基因启动子区域甲基化可能参与内异症的发病机制<sup>[43-44]</sup>。对内异症患者异位内膜组织与在位内膜组织中 HOXA10 与 PTEN 基因启动子甲基化比较分析发现它们之间没有显著差异，提示内异症患者在位内膜与异位内膜可能在 HOXA10 与 PTEN 基因启动子甲基化方面有相似的特性，这于朗景和教授提出的“子宫内膜异位症在位内膜决定论”理论相符。

本实验发现不同临床分期内异症患者异位内膜组织中 HOXA10 基因启动子区 5' CpG 岛的甲基化发生率不同，III-IV 期的甲基化发生率高于 I-II 期 ( $P < 0.05$ )，这可能提示 HOXA10 基因启动子区 5' CpG 岛甲基化程度与内异症的临床分期可能有关，在内异症的进展中可能起作用。而对 III-IV 期与 I-II 期内异症中 PTEN 基因甲基化发生率作比较，差异无显著性，但 PTEN 基因在 III-IV 期中的甲基化率在数值上是高于 I-II 期中的，可能是由于样本量过小而造成实验结果的误差，有待今后研究加大样本量进一步研究。

在本实验中设立了甲基化阳性对照（标准 M 带），非甲基化阴性对照（标准

U 带), 空白对照 (无 M, U 带), 而且 PCR 反应了两轮, 用第一轮 PCR 产物稀释后作为第二轮 PCR 的 DNA 模板, 同时退火温度是降落温度, 这样既提高了 MSP 产物的特异性, 减少引物二聚体的产生, 也提高了特异性产物的产量。使 MSP 方法更可靠, 更可信, 更有效地检测出特异性产物。

## 四 总结

本文总结了相关领域的研究进展,应用甲基化特异性聚合酶链反应(MSP),对内异症患者在位、异位内膜组织中 HOXA10 与 PTEN 基因启动子甲基化情况进行了探索性的研究,主要研究结果为:

1. HOXA10 与 PTEN 基因在异位内膜组织中表现为高甲基化状态,而在正常子宫内膜组织中表现为非甲基化状态;
2. HOXA10 基因在III、IV期内异症患者异位内膜组织中的甲基化显著高于 I、II 期,临床期别越晚,HOXA10 基因甲基化程度越高。

## 五 本研究存在的不足及创新

1. 研究例数尚少，特别表现在内异症分期方面的研究。有待今后研究加大样本量进一步研究。

2. 本次研究未能在蛋白水平检测内异症患者在位，异位内膜和正常对照子宫内膜组织 HOXA10、PTEN 的表达情况，尚有待进一步从蛋白水平加以证实。

3. 未能按计划取到子宫内膜异位症恶变的组织标本。

虽然我们的研究存在一些不足之外，但我们的研究具有创新性，探索性，并得出了一些有意义的初步结果：以往探讨内异症的甲基化情况只限于在位内膜方面，本研究首次探讨 HOXA10、PTEN 基因在内异症患者异位内膜组织的甲基化情况，首次探讨内异症患者在位内膜组织中 PTEN 基因甲基化情况，以及评价它们甲基化程度在内异症中不同临床分期中的差异，为今后大样本临床研究，尤其是内异症恶变与 HOXA10、PTEN 基因甲基化的研究等方面提供了初步的科研资料。

参考文献

- [1] 连利娟主编.林巧稚妇科肿瘤学.北京:人民卫生出版社,1996 :757
- [2] Brincat M,Galea R,Buhagiar A. Polycystic ovaries and endometriosis:a possible connection. *Br J Obstet Gynecol*,1994,101 (4) :346
- [3] Cornillie FJ,Oosterlynck D,Lauweryns JM,et al. Deeply infiltrating pelvic endometriosis :histology and clinical significance. *Fertil Steril* ,1990,53 (6) :978
- [4] Sampson J. Peritoneal endometriosis due to menstrual dissemination of endometrial tissue into the peritoneal cavity. *Am J Obstet Gynecol*, 1927, 14:422-469
- [5] Giudice LC,Tazuke SI, Swiersz L.Status of current research on endometriosis.*J reprod Med*,1998,43 Suppl: 252-262
- [6] Konincla PR, Barlow D, Kennedy S. Implantation versus infiltration:the Sampson versus the endometriotic disease theory. *Gynecol Obstet Invest*, 1999,47(1):3-9
- [7] Selam B, Arici A .Implantation defect in endometriosis: endometrium or peritoneal fluid,2000, Suppl 55:121-128
- [8] Gaetje R, Kotzian S, Herrmann G, et al. Invasiveness of endometriotic cells in vitro.*Lancet*,1995,346(8988):1463-1464
- [9] Osteen KG, Keller NR, Feltus FA, Melner MH. Paracrine Regulation of Matrix Metalloproteinase Expression in the Normal Human Endometrium. *Gynecol Obstet Invest*, 1999, 48 Suppl151:2-13
- [10] Rodger WH, Osteen KG,Matrisian LM,et al,patters of matrix metallo protein aseexpression in cycling endometrium impiy differential function and regulation steroid hormones. *J Clin Invest*,1994, 94: 946-953
- [11] Fujimoto J, Sakaguchi H, Hirose R, et al. Angiogenesis in Endometriosis and Angi-ogenic Factors. *Gynecol Obstet Invest*, 1999, 48 Suppl 51:14-20
- [12] Osteen KG, Sierra Rivera E. Does disruption of immune and endocrine systems by environmental toxins contribute to development of endometriosis? *Semin-Reprod-Endocrinol*,1997,15(3):301-308
- [13] McLaren J, Prentice A, Charnock-Jones DS, et al. Vascular endothelial growth

- factor concentrations are elevated in in peritoneal fluid of women with endometriosis. *Hum Reprod*,1996,11(1): 20-223
- [14] Ballouk F,Ballouk F, Ross JS, Wolf BC Ovarian endometriotic cysts.An analysis of cytologicatypia and DNA ploidy patterns.et al.*Am J Clin pathol*,1994, 102(4):415--419
- [15] Kennedy SH. Mardon HJ and Barlow DH et al.Familiar endometriosis.*J Assist Reprod Genet*,1995,12(1):32-34
- [16] Rajesh V, Terance R, Janesh K, et al. Endometriosis and the neoplastic process. *Society for reproduction and Fertility*, 2004, 127: 293
- [17] Brinton LA,Gridley G,Persson I,et al. Cancer risk after a hospital discharge diagnosis of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*,1997,176(3):572-579
- [18] MarYoshikawa H, Jimbo H, Okada S, et al. Prevalence of endometriosis in ovarian cancer. *Gynecol Obstet Invest*,2000,50(11):11-17
- [19] Jiang X,Morland SJ,Hithcock A,et al.Allelotyping of endometriosis with adjacent ovarian carcinoma reveals evidence of a common lineage.*Cancer Res*,1998, 58:1707-1712
- [20] GreerCE,PetersonSL,KiviatBN,et al.PCR amplification from paraffin. embedded tissues. Effects of fixative nad fiaction time. *Am J Clin Pathol*, 1991,95(2):117-124.
- [21] Mies,Huoldsworth,Chaganti RS.Extraction of DNA from paraffin blocks for southern blot analysis.*Am J Surg Pathol*,1991,15(2):169-174
- [22] Elena R,Rivero,Adriana C,et al simple salting out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin embedded tissues.*Pathology-Research and practice*, 2006,202(7):523-529
- [23] Cheng W, Liu J,Yoshida H,et al. Lineage infidelity of epithelial ovarian cancers is controlled by HOX genes that specify regional identity in the reproductive tract.*Nat Med*, 2005, 11(5): 531
- [24] Sarno JL,Kliman H,Taylor HS. HOXA10, Pbx2 and Meis1 protein expression in the human endometrium: formation of multimeric complexes on HOXA10 target genes.*J Clin Endocrinol Metab* 2005,90:522-8

- [25] Yoshida H, Broaddus R, Cheng W, et al. Deregulation of the HOXA10 homeobox gene in endometrial carcinoma: role in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*, 2006,66(2):889
- [26] Chu MC, Selam FB, Taylor HS. HOXA10 regulates p53 expression and Matrigel invasion in human breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2004,3:568–72.
- [27] Taylor HS, Bagot C, Kardana A, et al. HOX gene expression is altered in the endometrium of women with endometriosis. *Hum Reprod*, 1999, 14(6): 1328–1331
- [28] Wu Y, Halverson G, Basir Z, et al. Aberrant methylation at HOXA10 may be responsible for its aberrant expression in the endometrium of patients with endometriosis. *Am J Obstet Gynecol*, 2005, 193: 371
- [29] UJ, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer, *Science* (Washington DC), 1997;275:1943-1947
- [30] Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, et al. Identification of a candidate tumor suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancer. *Nature Genetics*, 1997,15(4):356-358
- [31] Salvesen HB, MacDonald N, Ryan A, Jacobs IJ, Lynch ED, Akslen LA, Das S. 2001. PTEN methylation is associated with advanced stage and microsatellite instability in endometrial carcinoma. *Int J Cancer* 91:22–26
- [32] K. F. Tam · V. W. S. Liu · S. S. Liu · P. C. K. Tsang. Methylation profile in benign, borderline and malignant ovarian tumors. *Cancer Res Clin Oncol*, 2007 (133):331–341
- [33] Okano M, Bell DW, Haber DA, et al. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 1999,99: 247-257
- [34] Lau QC, Raja E, et al. RUNX3 is frequently inactivated by dual mechanisms of protein nuclear localization and promoter hypermethylation in breast cancer. *Cancer Res*, 2006,66:6512-6520.
- [35] Jose M. Garcia, Javier Silva, Cristina Penff. Promoter Methylation of the PTEN

- Gene Is a Common Molecular Change in Breast Cancer[J]. *Genes, chromosomes & cancer*, 2004(41):117-124
- [36] Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory[J]. *Genes Dev*, 2002, 16(1):6-21
- [37] Fdnberg AP. Cancer epigenetics takes center stage[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(2):392-394
- [38] Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future[J]. *OncoGene*, 2002, 21(35):5427-5440
- [39] McClelland M. The effect of sequence specific DNA methylation on restriction endonuclease cleavage[J]. *Nucleic Acids Res*, 1981, 9(22):5859-5866
- [40] 李淑娟, 郭科军, 花向锋等. PTEN 蛋白在卵巢子宫内膜异位囊肿及卵巢子宫内膜样癌组织中的表达及临床意义[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2008, 24(4):285-288
- [41] 彭丽秀, 张怡, 周昌菊. 抑癌基因 PTEN、p27 与内异症发病的关系[J]. *生殖与避孕*, 2007, 27(8):533-536
- [42] 蔡知天, 李楷滨, 武玉. 抑癌基因 PTEN 在内异症中的表达及意义[J]. *中国实验诊断学*, 2007, 11(7):896-999
- [43] Kim JJ, Taylor HS, Lu Z, Ladhani O, Hastings JM, Jackson KS, Wu Y, Guo SW, Fazleabas AT. Altered expression of HOXA10 in endometriosis: potential role in decidualization. *Mol Hum Reprod*, 2007, 13: 323-330
- [44] Lee B, Du H, Taylor HS. Experimental Murine Endometriosis Induces DNA Methylation and Altered Gene Expression in Eutopic Endometrium. *Biol Reprod*. 2008, 21:457-462

## 文献综述

### 子宫内膜异位症恶变的研究进展

熊美丽 综述 宗利丽 审校

[摘要]子宫内膜异位症是生育期妇女的常见病，虽为良性病变，却具有类似恶性肿瘤远处转移和种植生长的特性，约有1%左右的患者发生恶变，恶变多为子宫内膜样癌和透明细胞癌。子宫内膜异位症发生及其恶变机制尚不清楚，成为临床与基础的研究焦点，本文主要从流行病学、高危因素、临床病理、发病机制等几个方面对子宫内膜异位症恶变的研究进展予以综述。

[关键词]子宫内膜异位症；恶变；卵巢癌

子宫内膜异位症(endometriosis, EM)，是指具有生长功能的子宫内膜组织出现在子宫腔被覆粘膜以外的身体其它部位，生育年龄妇女的发病率约为7%-15%<sup>[1]</sup>。现报道的恶变发病率为0.7%-1.6%<sup>[1]</sup>，恶变最常见部位为卵巢，恶变组织类型主要是子宫内膜样癌和透明细胞癌，关于EM恶变的研究越来越受到重视，下面分别从流行病学、病理、及发病机制等方面综述近年来的研究概况和进展。

#### 1. EM恶变的流行病学和临床高危因素的研究

1925年Sampson首次报道了EM恶变病例，此后国内外就不断有同类病例报道，病例中EM恶变多发生在卵巢，因此又称为EM相关性卵巢癌(endometriosis-associated ovarian, EAOC)。Brinton等<sup>[2]</sup>调查了1969-1983年的20686例EM患者，平均随诊11.4年，结果显示：EM患者发生卵巢癌的相对危险性是1.9，随诊>10年者，EM患者发生卵巢癌的相对危险性上升为4.2。Melin等<sup>[3]</sup>研究了从1969-2000年的64492例EM患者，发现EM患者发生恶性肿瘤的发病率(SIR)为1.04，卵巢癌的SIR值为1.43。研究数据还提示早期诊断和长期存在的EM发生卵巢癌的风险性较高，SIR值为2.01-2.23。在诊断EM之前或诊断当时行子宫切除的患者卵巢癌的发病率不高，因此有些学者认为切除子宫能

预防卵巢癌的发生。

目前比较公认的与 EM 相关恶性肿瘤的临床高危因素有：①体内高雌激素水平，如雌激素替代治疗。Zanetta 等<sup>[4]</sup>的研究认为长期单纯服用雌激素是 EM 恶变的危险因素，尤其是卵巢外 EM 病灶恶变与单用雌激素的关系更密切，孕激素对此激素有拮抗作用，单纯使用雌激素治疗，无孕激素拮抗增加 EM 的恶变。②达那唑可能与卵巢癌有相关性，Cottreau 等<sup>[5]</sup>的研究发现应用达那唑治疗 EM 发展为卵巢癌的危险性比不用达那唑治疗的增加 3.2 倍，而应用亮丙瑞林/那法瑞林治疗 EM 恶变危险性不增加。达那唑可使雄激素水平升高，而雄激素过剩与卵巢癌发生、发展密切相关。因此，认为达那唑治疗 EM 会增加恶变危险性。③EM 不孕不育会增加卵巢癌的发病率，Brinton 等<sup>[6]</sup>的回顾性研究调查了 1965-1988 年的 12193 例不孕的美国妇女，发现不育病人比普通人群的恶变率高，其 SIR 值为 1.23，不孕（主要指原发不孕）病人的恶变率甚至更高，其 SIR 值达 1.43。④口服避孕药(OCPs)、分娩、多产、行输卵管结扎术及子宫切除术等因素均能降低 EM 恶变为卵巢癌的发生率<sup>[7]</sup>。另外还有研究表明病程、月经情况、环境、遗传等因素也与 EM 发生恶变有关。

## 2. EM 恶变的临床病理特点的研究

1925 年 Sampson 首次报道恶性肿瘤与异位子宫内膜并存于同一病变中，并提出异位子宫内膜恶变确诊需符合以下 3 个条件：①癌组织和异位内膜并存于同一病变中；②二者具有组织学相关性；③排除其他原发肿瘤的存在。1953 年 Scott 在此基础上补充了诊断标准即显微镜下见异位子宫内膜向恶性移行的形态学证据，上述病理诊断标准已得到国际公认。Yoshikawa 等<sup>[8]</sup>复习文献时指出在卵巢癌患者中，同时存在 EM 病灶占 14.1%，其中透明细胞癌占 39.2%，子宫内膜样癌占 21.2%，浆液性癌占 3.3%，粘液性癌占 3.0%。Surprasert 等<sup>[9]</sup>调查了 1995-2005 年的 1076 例卵巢癌患者发现有 37 例合并 EM，这 37 例中组织类型最多的是透明细胞癌，其次是子宫内膜样癌，进一步证明 EM 恶变以子宫内膜样癌和透明细胞癌为主。EM 在组织病理学上可表现为不典型子宫内膜异位症 (a

typical endometriosis aEM), 此概念在 1988 年首先被 LaGrenade 和 Silverberg 提出: 指异位内膜腺上皮的不典型或核异型性改变, 其病理形态特点为细胞核深染或淡染、苍白, 伴有中至重度异型性; 核/浆比例增大、细胞密集、复层或簇状突。Fukunaga 等<sup>[10]</sup>观察发现卵巢 EM 很少发生 aEM, 但 EAOC 病例标本常常能观察到 aEM, 特别是透明细胞癌和子宫内膜样癌, 在恶变上皮的邻近组织也能观察到 aEM, 因此指出 aEM 可能为潜在的癌前病变, 癌组织或许来源于 aEM 的残留组织, 这表明 aEM 可能在 EM 恶变起主要作用。EM 恶变的临床特点可以总结为以下几点: ①恶变的发生部位以发生在卵巢为主; ②合并 EM 的卵巢癌以子宫内膜样癌和透明细胞癌居多; ③恶变患者年龄较为年轻, 平均年龄 44(25~62)岁<sup>[9]</sup>; ④EM 患者的卵巢癌、乳腺癌、非何杰金淋巴瘤的患病危险也增加<sup>[11]</sup>。

### 3. EM 恶变机制的研究

人类肿瘤发生机制主要与分子水平异常、环境、遗传等因素有关, EM 恶变的机制也一样。下面分别从这几方面予以阐述。

#### 3.1 EM 恶变的分子生物学基础

##### 3.1.1 EM 恶变与杂合性丢失 (Loss of Heterozygosity, LOH)

LOH 是目前分子生物学领域研究抑癌基因染色体位点的主要手段之一, 根据病变组织中候选 DNA 片段的丢失频率, 即 LOH 发生频率, 判断该染色体位点附近可能存在肿瘤抑制基因的丢失。在 EM 患者异位内膜组织 DNA 微卫星研究中, 染色体 1p, 11q 和 19pLOH 发生率分别为 69%, 43% 及 45%, 由此认为位于 1p 的肿瘤抑癌基因很有可能在 EM 发生、发展过程中起重要作用<sup>[11]</sup>。Ali-Fehmi 等<sup>[12]</sup>在研究基因组 DNA 中发现, 10 号染色体 3 位点经过多聚酶链反应扩增后, EM 病灶 LOH 发生率为 4.3%, 而子宫内膜样癌 LOH 发生率为 23.5%, 并且指出在 D105608 的 LOH 很有可能是 EM 恶变的重要分子机制。

##### 3.1.2 EM 恶变相关基因的研究

研究显示多种癌基因和抑癌基因, 如 Bcl-2、p53、k-ras、PTEN 基因等表达

异常和突变可能会导致异位子宫内膜细胞发生恶变<sup>[13-16]</sup>。下面分别予以阐述:

Bcl-2 基因是近年发现的一种抑制凋亡的癌基因, 编码 26KD 的蛋白质, 称 Bcl-2 蛋白, 它可抑制由多种因素介导的细胞凋亡, 不影响细胞增殖, 而是作为细胞凋亡的抑制剂调节细胞的死亡。Bcl-2 的过度表达可减少细胞死亡, 引起增殖性病变或肿瘤发生, 在卵巢异位子宫内膜不典型增生向恶性转化过程中起重要作用。钱建华等<sup>[13]</sup>采用免疫组化法检测卵巢内异组 (22 例)、卵巢 EM 腺上皮不典型增生组 (14 例)、卵巢 EM 癌变组 (22 例) 的 Bcl-2 蛋白表达。结果: 癌变组内异区 Bcl-2 蛋白表达阳性率显著高于内异组, 不典型增生组内异区 Bcl-2 蛋白表达阳性率显著高于内异组, 由此推测 Bcl-2 的过度表达可能参与了 EM 癌变的过程, Bcl-2 蛋白阳性的 EM 可能是癌前病变。

p53 过分表达与 aEM 和 EAOE 的发生有关, Sainz 等<sup>[14]</sup>研究了 1948-1999 年的 410 例卵巢癌患者和 521 例 EM 患者, 发现 410 例卵巢患者中有 17 例合并 EM, 其中 14 例 (82.4%) p53 基因发生过度表达, 且发现所有的 aEM 均出现 p53 过度表达, p53 过度表达诊断 aEM 和 EAOE 的敏感性为 87%, 这提示 P53 对预测 EM 是否发生恶变有一定的价值。Okuda 等<sup>[15]</sup>从卵巢癌组织中提取 DNA, 靶序列通过多聚酶链反应扩增 p53 基因的外显子 5, 6, 7, 8 后测序分析发现 p53 基因在子宫内膜样癌的突变率为 63.0%, 第 5 外显子主要是 TAC 突变成 TGC, 第 6 外显子主要是 CGA 突变成 CTA, 第 7 外显子主要是 TGC 突变成 TTC, 第 8 外显子主要是 TGT 突变成 GGT; 而在透明细胞癌没有发现突变, 说明 p53 突变主要发生在子宫内膜样癌。

Otsuka 等<sup>[16]</sup>调查了 1987-1999 年的 37 例患有透明细胞癌的日本病人, 每例通过激光显微切割分析后发现 k-ras 突变能在透明细胞癌组织病变上观察到, 而在 EM 及 aEM 上则没有观察到, 提示 k-ras 突变可能与 EM 转化为透明细胞癌有关。PTEN 为抑癌基因, 定位于染色体 10q23. 3, PTEN 能够去除酪氨酸及丝氨酸磷酸基团, 并通过抑制 PI3K 信号系统和影响 MAPK 信号级联调节细胞生长、增殖、迁移等多种效应, PTEN 基因的突变见于多种恶性肿瘤中。2000 年 Nakako

等<sup>[17]</sup>检测了 20 例卵巢子宫内膜样癌, 24 例透明细胞癌及 34 例卵巢内 aEM 患者的子宫内膜样本后发现 PTEN 基因在第 5 和第 6 位外显子处发生了移码突变, 突变率分别为 20.0%, 8.3%和 20.6%。在异位子宫内膜来源的肿瘤中, 多数可在异位内膜和癌组织中同时检出 PTEN 突变, 没有只在 EM 病变处检出 PTEN 突变, 而癌组织中检出阴性的病例。这意味着: PETN 抑癌基因的失活在卵巢子宫内膜样癌, 透明细胞癌及 aEM 的癌变中机制相似, 并且可能是 EM 恶变的机制之一。

### 3.1.3 EM 恶变与相关基因 DNA 甲基化的研究

越来越多的研究认为 DNA 甲基化与 EM 的发生与恶变密切相关, 例如最近研究报道<sup>[18-21]</sup>, HOXA10、PTEN、PRB、hMLH1 等基因的甲基化可能参与了 EM 的发生及恶变。Wu 等<sup>[19]</sup>对 EM 患者 HOXA10 基因的表现遗传表型做了研究, 收集 6 例经腹腔镜手术证实为 EM 患者的在位子宫内膜和 4 例因行输卵管结扎经腹腔镜排除 EM 的对照者在位内膜, 用甲基化特异性 PCR 技术 (Methylation-specific PCR, MSP) 和亚硫酸盐测序的方法, 检测了 HOXA10 基因启动子 2 个区域中的 3 个片段的甲基化模式, 发现在所有 3 个片段序列中, 病例组较对照组 CpG 岛位点呈高度甲基化状态, 且这种异常甲基化模式具有统计学意义。进而认为, HOXA10 基因的高甲基化可能参与了 EM 的发生发展。2006 年, K.F.Tam 等<sup>[20]</sup>对比良性、交界性、恶性卵巢肿瘤中 9 个抑癌基因甲基化状况以探讨 DNA 甲基化与卵巢肿瘤的关系, 其中包括 PTEN 基因, 分别检测了 89 例卵巢癌、16 例交界性卵巢肿瘤、19 例良性卵巢肿瘤、16 例正常卵巢组织、5 株卵巢癌细胞株中 9 个抑癌基因启动子 CpG 的甲基化状况, 结果发现它们对应的甲基化率分别为 28.8%、20.1%、10.5%、11.8%、42.2%, 从而认为交界性卵巢肿瘤、卵巢癌的甲基化率明显高于良性卵巢肿瘤与正常卵巢组织, 基于 EM 与卵巢癌的关系, PTEN 基因的高甲基化可能在 EM 及恶变中起作用, 吕艳文等<sup>[21]</sup>研究了 62 例 EM 患者在位内膜孕激素受体 B (PRB) 基因的甲基化状况, 结果发现 EM 和对照组中 PRB 甲基化率分别为 61/62 和 22/33, 两组 PRB 的甲基化差异有统计学意义( $P < 0.01$ ), 认为 PRB 基因的高甲基化可能参与了内异

症及恶变的发生,但目前这方面研究还未成熟,尚处于探索阶段,DNA甲基化与EM的发生及其恶变有待进一步研究。

### 3.2 EM恶变与雌孕激素及其受体调节的研究

Ness<sup>[22]</sup>报道过多的雌激素和孕激素会促使EM的生长、侵袭和恶变。有研究报道EM患者中绝经后更易恶变,因为EM及子宫内膜样癌均有雌、孕激素受体及其亚型的表达,绝经后患者体内激素水平变化,通过与受体作用直接影响了病灶的转归,可能会促使EM恶变。Akahane等<sup>[23]</sup>研究发现,从EM到aEM到卵巢透明细胞癌的恶变过程中,雌、孕激素受体(ER和PR)表达逐渐减弱,提示激素依赖性的消失可能与卵巢EM恶变为卵巢透明细胞癌有关。

### 3.3 EM恶变与环境遗传因素

1999年Bruner等在研究子宫内膜基质金属蛋白酶(MMPs)的表达与二恶英的关系中发现,二恶英可使孕激素抑制子宫内膜异位生长的能力降低。病因分析为:二恶英通过对激素受体或信号传导通路发生作用,高表达P450基因,激活癌基因或诱导雌激素合成,促进EM的发生及转变。1998年Kennsy进行的流行病学调查发现EM发病有以下特点:①家族聚集性;②患者一级亲属发病率显著高于人群发病率。由此可以推断环境遗传因素在EM恶变的机制中可能也有一定的作用,相关结论有待于进一步的研究。

综上所述,EM是一种不可忽视的疾病,尤其要注意其恶变,应该被考虑为卵巢癌的危险因素,其恶变机制还有很多悬而未决的问题,都尚有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] Rajesh V, Terance R, Janesh K, et al Endometriosis and the neoplastic process[J]. Society for Reproduction and Fertility,2004,127:293-304
- [2] Brinton LA, Gridley G, Persson I,et al Cancer risk after a hospital discharge diagnosis of endometriosis.[J] Am J Obstet Gynecol,1997,176(3):572-579
- [3] Melin A,Sparen P, Persson I, et al Endometriosis and the risk of cancer with special emphasis on ovarian cancer[J]. Human Reproduction, 2006,21

- (5):1237-1242 .
- [4] Zanetta GM,Webb MJ,Keeney G L,et al Hyperestrogenism: a relevant risk factor for the development of cancer from endometriosis[J].Gynecologic Oncology, 2000,79(1):18-22
- [5] Cotreau CM,Ness RB,Modugno F,et al Endometriosis and its treatment with danazol or Lupron in relation to ovarian cancer[J].Clin Cancer Res, 2003, 9:5142-5244
- [6] Brinton LA,Westhoff CL,Scoccia B, et al Causes of Infertility as Predictors of Subsequent Cancer Risk[J].Epidemiology,2005,16(4):500-507
- [7] Modugno F, Ness RB, Allen GO, et al Oral contraceptive use, reproductive history, and risk of epithelial ovarian cancer in women with and without endometriosis[J]. American Journal of Obstetrics & Gynecology, 2004,191 (3) : 733-740
- [8] Yoshikawa H, Jimbo H, Okada S, et al Prevalence of endometriosis in ovarian cancer[J]. Gynecol Obstet Invest,2000,50(1):11-17
- [9] Surprasert P,Khunamornpong S,Srisomboon j,Clinicopathological features and prognosis of Thai women with endometriosis-associated ovarian carcinoma[J]. Asian Pac J Cancer Prev,2006,7(4):638-640.
- [10] Fukunaga,Masaharu MD, Atypical Ovarian Endometriosis[J].Pathology Case Reviews. 2006,11(1):38-42
- [11] OKADA S,TSUDA H,TAKARABE T,et al Allelotype analysis of common epithelial ovarian cancers with special reference to comparison between clear cell adenocarcinoma with other histological types[J]. Japanese Journal of Cancer Research,2002,93(7):798-806
- [12] Ali-Fehmi, Rouba M.D, Khalifeh, I,et al Patterns of Loss of Heterozygosity at 10q23.3 and Microsatellite Instability in Endometriosis,Atypical Endometriosis, and Ovarian Carcinoma Arising in Association With Endometriosis.International Journal of Gynecological Pathology.2006, 25(3):223-229
- [13] 钱建华, 石一复, bcl—2、p53 蛋白表达在卵巢子宫内膜异位症癌变过程中的作用[J]. 中华肿瘤杂志,2001,23:403-406

- [14] R Sainz de la Cuesta, M Izquierdo, M Canamero, et al Increased prevalence of p53 overexpression from typical endometriosis to atypical endometriosis and ovarian cancer associated with endometriosis. *European Journal of Obstetrics Gynecology, & Reproductive Biology*, 2004, 113(1):87-93
- [15] T Okuda, J Otsuka, A Sekizawa, et al p53 mutations and overexpression affect prognosis of ovarian endometrioid cancer but not clear cell cancer[J]. *Gynecologic Oncology*. 2003, 88(3):318-325
- [16] Otsuka J, Okuda T, Sekizawa A, et al K-ras mutation may promote carcinogenesis of endometriosis leading to ovarian clear cell carcinoma[J]. *Med Electron Microsc*. 2004, 37(3):188-192
- [17] N Sato, H Tsunoda, M Nishida, et al Loss of Heterozygosity on 10q23.3 and Mutation of the Tumor Suppressor Gene PTEN in Benign Endometrial Cyst of the Ovary: Possible Sequence Progression from Benign Endometrial Cyst to Endometrioid Carcinoma and Clear Cell Carcinoma of the Ovary. *Cancer Research* 2000, 60(15), 7052-7056
- [18] Taylor HS, Bagot C, Kardana A, et al. HOX gene expression is altered in the endometrium of women with endometriosis[J]. *Hum Reprod*, 1999, 14(6):1328-1331
- [19] Wu Y, Halverson G, Basir Z, et al. Aberrant methylation at HOXA10 may be responsible for its aberrant expression in the endometrium of patients with endometriosis[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2005, 193: 371-375
- [20] 吕艳文, 张淑兰, 孕激素受体基因多态性与子宫内膜异位症的关系[J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2007, 23(1):56-57
- [21] K. F. Tam, V. W. S. Liu, S. S. Liu, et al. Methylation profile in benign, borderline and malignant ovarian tumors[J]. *Cancer Res Clin Oncol*, 2007, (133):331-341
- [22] Ness RB, Endometriosis and ovarian cancer. thoughts on shared pathophysiology. *AM J Obstet Gynecol*, 2003, 189(1):280-294
- [23] T Akahane, A Sekizawa, T Okuda, et al. Disappearance of Steroid Hormone Dependence During Malignant Transformation of Ovarian Clear Cell Cancer. *International Journal of Gynecological Pathology*, 2005, 24(4):369-376

## 攻读学位期间成果

1. 熊美丽, 宗利丽, 何援利, 等.HOXA10 基因启动子区 5' CpG 岛甲基化在子宫内膜异位症发生发展中的作用. 解放军医学杂志, 2009, 34 (4): 445-447
2. 熊美丽, 宗利丽. 子宫内膜异位症恶变的研究进展. 已投稿
3. 熊美丽, 宗利丽, 何援利, 等.子宫内膜异位症 PTEN 基因启动子区 5' CpG 岛甲基化的研究. 已投稿

## 致 谢

课题从提出、论证到实施都是在导师宗利丽副教授的指导下顺利完成的，感谢导师在学业上的悉心指导和生活的关怀。导师有渊博的学识、敏锐的思维、严谨的治学态度、孜孜不倦的工作热情，是学生的骄傲和学习的榜样，导师三年来对我潜移默化的影响将使我终生受益！

感谢珠江医院妇产科何援利主任、潘石蕾副教授、杨进副教授、彭冬先副教授、刘木彪副教授、陈燕英老师、师姐马颖、付霞霏等和同学，感谢他们在工作、学习、生活上给予我的无微不至的关心和照顾！

感谢中心实验室全体老师的亲切关怀和细心指导，是你们给我提供了难得的学习机会和科研气氛浓厚的实验场所，各位老师的睿智、博学和一丝不苟的科学精神值得我永远学习！

感谢珠江医院妇产科的全体医护人员及研究生队的各位老师、同学三年来给予的支持。

感谢我的家人，你们的关怀和爱护是我永远的动力！你们全方面的支持，让我能全身心投入到科研工作中！

特别感谢我的朋友朱洋立，感谢他在论文写作过程中对我的大力支持和无私关怀，谨将此论文作为一份真诚的礼物送给他，愿他在今后的生活和事业中取得更大、更好的成绩！

值此论文完成之际，谨向所有给予我关心、支持和帮助我的老师、同学、朋友和家人表示深深的谢意！

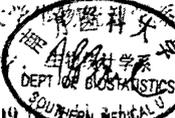
新的征程期待着我用更加辉煌的成绩来回大家对我的殷切期望，我会加倍努力的！

# 统计学证明

编号: M09-0277

## 研究生毕业论文统计学审稿证明

兹有硕士研究生 熊美丽 的论文 (编号: M09-0277) 《HOXA10、PTEN 基因启动子甲基化与子宫内膜异位症相关性研究》中有关统计学方面的内容, 经我系审定合格, 特此证明。

南方医科大学 生物统计学系  
主任签字:   
DEPT OF BIostatISTICS  
SOUTHERN MEDICAL U  
2009