

· 论 著 ·

雌激素受体基因多态性与子宫内膜异位症、子宫肌腺症的相关性研究*

陈富强,汪爱萍,范丽安,杨玉琴
(上海市浦东新区妇幼保健院 201206)

摘要:目的 探讨雌激素受体基因 ER α 多态性是否与子宫肌腺症、子宫内膜异位症的发病相关。方法 应用聚合酶链反应(PCR)和限制性片断长度多态性分析(RFLP)检测 68 例子宫肌腺症、56 例子宫内膜异位症患者和 78 例正常健康妇女 ER α 基因型。结果 ER α Pvu II 基因频率 pp、Pp、PP 在子宫肌腺症组和对照组分别为:38.2% vs 39.7%、42.6% vs 48.7%、19.1% vs 11.5%; Xba I 基因型频率 xx、Xx、XX 在子宫肌腺症组和对照组分别为 61.7% vs 56.4%、32.4% vs 41.0%、5.4% vs 2.6%, 两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。Pvu II 基因型频率 pp、Pp、PP 在子宫内膜异位症组和对照组分别为:44.6% 和 39.7%、37.5% 和 48.7%、17.9% 和 11.5%; Xba I 基因型频率 xx、Xx、XX 在子宫内膜异位症组和对照组分别为 64.2% 和 56.4%、32.1% 和 41.0%、3.6% 和 2.6%, 两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$); ER α 多态性与子宫内膜异位症患者临床分期也无关联。结论 雌激素受体基因 ER α 多态性可能与上海地区子宫肌腺症、子宫内膜异位症的发病无关联。

关键词:受体,雌激素;子宫内膜异位症;基因多态性;子宫肌腺症

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.13.008

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)13-1269-03

Study of relationship between polymorphism of estrogen receptor-alpha gene with endometriosis and adenomyosis*

Chen Fuqiang, Wang Aiping, Fan Lian, Yang Yuqin

(Department of Obstetrics and Gynecology, Pudong New Area Women and Children Hospital, Shanghai 201206, China)

Abstract: Objective To determine whether polymorphism of estrogen receptor-alpha gene(ER α) is associated with adenomyosis and endometriosis in Shanghai area Chinese Hans population. Methods Determination of polymorphisms in the ER α gene was performed by polymerase chain reaction(PCR)restriction fragment-length polymorphism(RFLP)analysis in 56 affected endometriosis, 68 adenomyosis patients and 78 normal controls respectively. Results The genotype frequencies of Pvu II pp Pp PP were 38.2%, 42.6%, 19.1%, and Xba I xx Xx XX were 61.7%, 32.4%, 5.4% in the patients of adenomyosis. The genotype frequencies of Pvu II pp Pp PP were 44.6%, 37.5%, 17.9% and Xba I xx Xx XX were 64.2%, 32.1% and 3.6% in the patients of endometriosis. The genotype frequencies of Pvu II pp Pp PP were 39.7%, 48.7%, 11.5% and Xba I xx Xx XX were 56.4%, 41.0% and 2.6% in control, respectively. No significant difference in the frequency of either of PvuII and Xba I polymorphisms in the ER α gene was found between endometriosis or adenomyosis patients and the control($P > 0.05$). There was no relationship between the polymorphisms in the estrogen receptor alpha with stage of endometriosis also. Conclusion Polymorphism in the gene encoding for ER α probability is not correlated with the occurrence of endometriosis and adenomyosis in Shanghai area Chinese Hans population.

Key words: receptors, estrogen; endometriosis; gene polymorphisms; adenomyosis

近来国外有资料研究表明,子宫内膜异位症可能与雌激素受体基因多态性密切相关^[1-4],但是也有研究认为二者无关联^[5-6]。为进一步探讨雌激素受体基因多态性与子宫肌腺症、子宫内膜异位症的关系,作者对 68 例的子宫肌腺症、56 例子宫内膜异位症患者进行了研究,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2002 年 5 月至 2005 年 3 月在本院及浦东公利医院住院的上海籍患者 124 例,其中子宫内膜异位症 56 例,年龄(35±10)岁;子宫肌腺症 68 例,年龄(41±13)岁。所有患者均经手术和病理证实,剔除同时合并两种疾病的患者。子宫内膜异位症患者按 1985 年修订的美国生育协会(RAFS)标准进行分期。选择同期在本院住院的年龄匹配的上海籍无子宫内膜异位症、子宫肌腺症、子宫肌瘤的患者 78 例为对照组,年龄 23~56 岁,平均(44±11);对照组妇女均月经正常,无痛经史并经过阴道 B 超和经腹腔镜或开腹手术证实无上述病变。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 抽取两组患者和对照组外周静脉血 10 mL,其中 5 mL 用依地酸二钠(EDTA-Na)抗凝,-20℃冰箱

冻存待检。

1.2.2 基因组 DNA 提取 采用盐析法,取冰冻全血室温解冻,裂解红细胞后在离心沉淀的白细胞中加入 3 mL 白细胞裂解液震荡悬浮,加入 10% 十二烷基硫酸钠(SDS)和蛋白酶 K 37℃ 酶解过夜,饱和 NaCl 盐析后取上清液加入二倍体积冰乙醇混匀后见絮状 DNA 析出。提取的 DNA 置于-20℃保存待检 ER α 基因。

1.2.3 引物设计与合成 参照有关文献设计引物,由上海生物工程公司合成,上游引物 5'-CTG CCA CCC TAT CTG TAT CTT TTC CTA TTC TCC-3';下游引物 5'-TCT TTC TCT GCC ACC CTG GCG TCG ATT ATC TGA-3'。

1.2.4 PCR 扩增 50 μ L PCR 反应体系中含 DNA 模板 50~100 ng, TaqDNA1.5 U, dNTP 各 200 μ mol/L, 2 种引物各 20 pmol, 石蜡油覆盖后, PCR 扩增仪(PE-480 型)上扩增。条件为:预变性 95℃ 5 min, 变性 94℃, 45 s, 复性 62℃, 60 s, 延伸 72℃, 60 s, 共 30 个循环;最后延伸 5 min。取产物 10 μ L 经 2% 琼脂糖凝胶电泳、紫外线灯下观察阳性带。

1.2.5 扩增产物的限制性酶切分析 分别取 PCR 扩增产物 10 μ L 用 12 U Pvu II, 20 U Xba I 于 37℃ 酶切 3 h。反应终

* 基金项目:上海市浦东新区社会发展局科研基金资助项目(PW-2003-A2)。

表 1 子宫肌腺症、子宫内膜异位症 ER α Pvu II 等位基因分布与对照组比较[n(%)]

组别	n	Pvu II 基因型			Pvu II 等位基因	
		pp	Pp	PP	p	P
内膜异位症组	56	25(44.6)	21(37.5)	10(17.9)	71(63.4)	41(36.6)
I 期	4	2(50.0)	2(50.0)	0(0.0)	5(62.5)	3(37.5)
II 期	13	6(46.1)	5(38.5)	2(15.4)	17(65.4)	9(34.6)
III 期	25	11(44.0)	9(36.0)	5(20.0)	31(62.0)	19(38.0)
IV 期	14	6(42.8)	5(35.7)	3(21.4)	18(64.3)	10(35.7)
子宫肌腺症组	68	26(38.2)	29(42.6)	13(19.1)	81(59.6)	55(40.4)
对照组	78	31(39.7)	38(48.7)	9(11.5)	100(64.1)	56(35.9)

表 2 子宫肌腺症、子宫内膜异位症 ER α 基因 Xba I 等位基因分布与对照组比较[n(%)]

组别	n	Xba I 基因型			Xba I 等位基因型	
		xx	Xx	XX	x	X
内膜异位症组	56	36(64.2)	18(32.1)	2(3.6)	90(80.4)	28(19.6)
I 期	4	2(50.0)	2(50.0)	0(0.0)	7(87.5)	1(12.5)
II 期	13	8(61.5)	5(38.5)	0(0.0)	19(73.1)	7(26.9)
III 期	25	17(68.0)	7(28.0)	1(4.0)	41(82.0)	9(18.0)
IV 期	14	9(64.3)	4(28.6)	1(7.1)	23(82.1)	5(17.9)
子宫肌腺症组	68	42(61.7)	22(32.4)	4(5.9)	106(77.9)	30(22.1)
对照组	78	44(56.4)	32(41.0)	2(2.6)	20(76.9)	36(23.1)

止后产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色 30 min, 以 DNA 片段长度标准为参考, 紫外线灯下观察结果。

1.3 统计学处理 基因型和等位基因频率采用直接基因计数法计算, 研究对象与 Hardy-Weinberg 平衡的符合程度, 各组等位基因频率比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 子宫内膜异位症、子宫肌腺症临床分期及病理检查结果

56 例子宫内膜异位症患者均经病理检查证实, 按 RAFS 标准临床分期结果为: I 期 4 例, II 期 13 例, III 期 25 例, IV 期 14 例。68 例子宫肌腺症患者均经病理检查证实。

2.2 限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) 分析 取 10 μ L ER α -PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 紫外灯下观察扩增结果, 鉴定其特异性。其产物片段长为 1.3 kb。RFLP 的结果用 P 或 p、X 或 x 表示, 限制性酶切位点存在者用小写字母表示, 缺失者用大写字母表示。ER 基因 Pvu II 内切酶位点多态性电泳结果为: PP 型(终产物为 1.3 kb 大小片段一条带)、Pp 型(终产物为 850 bp, 450 bp, 1.3 kb 大小的 3 条带)、pp 型(终产物为 850 bp, 450 bp 大小的 2 条带); 使用 Xba I 酶切可区分出 XX 型(1.3 kb 1 条带), Xx 型(1.3 kb, 910 bp, 390 bp) 3 条带, xx 型(910 bp, 390 bp) 2 条带。见图 1、2。

2.3 子宫内膜异位症 ER α 基因型与对照组比较 子宫内膜异位症 ER 基因 Pvu II、Xba I 多态性分别成功在 56 例患者及 78 例对照组鉴定出来。病例组和对照组 ER α Pvu II、Xba I 基因型频率相似, Pvu II 基因型频率 pp、pP、PP 病例组与对照组 ER α Pvu II、Xba I 基因型频率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 病例组和对照组 Xba I 基因型频率 xx、xX、XX 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。病例组和对照组经 Hardy-Weinberg 检测各等位基因符合遗传平衡。作者同时对子宫内膜异位症的 RAFS 分期进行了分析, 未发现 ER α 基因 Pvu II、Xba I 多态性与子宫内膜异位症的 RAFS 分期有相关性。见表 1、2。

2.4 子宫肌腺症 ER α 基因型与对照组比较 病例组与对照组 Pvu II 基因型频率 pp、pP、PP 比较差异无统计学意义 ($P >$

0.05); 病例组与对照组 Xba I 基因型频率 xx、xX、XX 比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。病例组和对照组经 Hardy-Weinberg 检测各等位基因符合遗传平衡, 未发现 ER α 基因 Pvu II、Xba I 多态性与子宫肌腺症发病的相关性。见表 1、2。

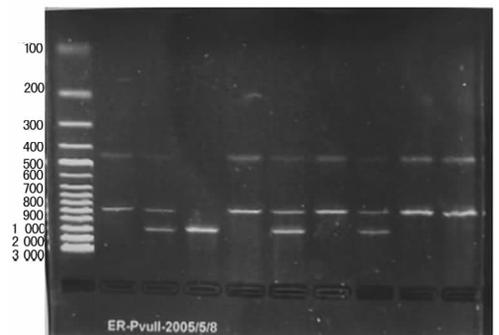


图 1 ER 基因 Pvu II 内切酶位点多态性电泳图谱

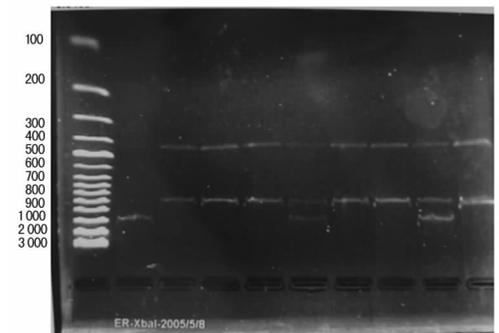


图 2 ER 基因 Xba I 内切酶位点多态性电泳图谱

3 讨 论

子宫内膜异位症常发生在生育年龄妇女, 发病率约 10%, 流行病学调查表明本病在双胎发病具有一致性, 患者的一级亲属发病率明显升高, 具有家族聚集性^[7]。环境因素和实验证据均显示雌激素在异位内膜生长中有重要作用, 尽管确切的分子机械转化作用还不清楚。目前对本病的治疗是阻断雌激素的

产生或者阻断其代谢作用。尽管子宫肌瘤与子宫内膜异位症在临床症状上表现完全不一样、病理上也不尽相同、对抗雌激素药物治疗的反应性也存在巨大差别,但是它们都同属于雌激素依赖性疾病,均好发于生育年龄妇女,研究证实子宫内膜异位症、肌腺症的异位内膜组织中均含雌激素受体、孕激素受体和雄激素受体,子宫内膜异位症和子宫肌瘤的这些组织病理学的相似特征表明二者可能具有相同的易感基因。

子宫内膜异位症与子宫肌瘤都同属于雌激素依赖性疾病,且具有家族倾向性,已知雌激素要发挥生理功能必须通过 ER 来介导,故 ER 可以作为子宫内膜异位症与子宫肌瘤的候选基因。ER 分为 ER α 及 ER β 两种类型,雌激素通过 ER 对正常及异位子宫内膜生长发挥重要作用。ER α 基因中 1 号内含子有两处常可发生点突变,分别发生在限制性内切酶 Pvu II、Xba I 的识别位点上,由于 1 号内含子中含有该基因的增强子、启动子等与基因的转录调控密切相关的重要调节序列,因而在其中发生点突变将可能影响到 ER α 基因的表达与功能,包括转录的活性、基因产物的蛋白合成和受体功能等,这些变化最终影响到体内雌激素的生物学效益^[8]。ER α 基因多态性与乳腺癌、骨质疏松的关系已经得到证实^[9-10],近年来有学者认为 ER α 基因多态性与子宫内膜异位症密切相关^[2-4],但是也有学者认为 ER α 基因多态性与子宫内膜异位症无关联^[5-6]。本研究结果未发现 Pvu II、Xba I 基因型与子宫内膜异位症及子宫肌瘤的关联性,作者对子宫内膜异位症患者进行了临床 RAFS 分期,通过检测不同时期的子宫内膜异位症患者 ER α 基因多态性变化与对照组比较,结果表明 ER α 基因多态性变化与子宫内膜异位症患者临床 RAFS 分期无关。此外作者还发现子宫肌瘤患者发病与 ER α 基因多态性也无关^[11]。本文 ER α Pvu II 基因频率分布特征与黄琪仁等^[12]对上海地区 237 例健康绝经妇女的调查结果类似,表明本研究具有群体代表性。富琪等^[13]及宋绿茵等^[14]分别对北京和广州地区的研究表明 ER α 基因多态性与子宫内膜异位症也无关联。

国外有研究认为 ER α 基因多态性与子宫内膜异位症有关,Hsieh 等^[3]在台湾地区对 119 例子宫内膜异位症患者的 ER α 基因重复性多态性分析表明 ER α 14AT 重复多态增加了其发病危险。有研究认为 ER α -351 Xba I * G 和 -397 Pvu II * C 基因是子宫内膜异位症的易感基因^[4];日本有研究认为子宫内膜异位症与 ER α 基因多态性无关而发现 ER β 可能与 IV 期子宫内膜异位症有关^[15]。作者对子宫内膜异位症患者进行了 RAFS 分期研究未发现 ER α 基因多态性与子宫内膜异位症的临床分期有关。Sato 等^[5]也认为 ER α 基因多态性与子宫内膜异位症无关联。Kitawaki 等^[2]对日本子宫肌瘤患者的 ER α 研究表明,子宫肌瘤与其发病密切相关,作者认为 PP 基因型患者与对照组比较发病率低,即 PP 基因型携带者对本病有保护作用,但该研究 67 例患者中也包括有子宫肌瘤患者,不但样本量太小,且各等位基因未达到遗传平衡,因此难有说服力。Oeler 等^[16]研究发现子宫肌瘤患者的 hER α 有点突变,有些突变部位可能严重影响了雌激素功能的发挥,作者认为这可能是本病不同于子宫内膜异位症,并且对抗雌激素治疗容易失败的原因。由于本研究样本量小,有待进行大样本量的研究进一步证实。

参考文献:

[1] Kitawaki j, Kado N, Ishihara H, et al. Endometriosis: the pathophysiology as an estrogen-dependent disease [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2002, 83(1): 149-155.

- [2] Kitawaki J, Obayashi H, Ishihara H, et al. Oestrogen receptor-alpha gene polymorphisms is associated with endometriosis, adenomyosis and leiomyomata [J]. Hum Reprod, 2001, 16(1): 51-55.
- [3] Hsieh YY, Chang CC, Tsai FJ, et al. Estrogen receptor alpha dinucleotide repeat and cytochrome P450c17alpha gene polymorphisms are associated with susceptibility to endometriosis [J]. Fertil Steril, 2005, 83(3): 567-572.
- [4] Hsieh YY, Wang YK, Chanq CC, et al. Estrogen receptor alpha-351 Xba I * G and -397 Pvu II * C-related genotypes and alleles are associated with higher susceptibilities of endometriosis and leiomyoma [J]. Mol Hum Reprod, 2007, 13(2): 117-122.
- [5] Sato H, Noqiera-de-Souza NC, Damora P, et al. Intron 1 and exon 1 alpha estrogen receptor gene polymorphisms in women with endometriosis [J]. Fertil Steril, 2008 90(6): 2086-2090.
- [6] Guo SW. Association of endometriosis risk and genetic polymorphisms involving sex steroid biosynthesis and their receptors: a meta-analysis [J]. Gynecol Obstet Invest, 2006, 61(2): 90-105.
- [7] Moen M, Magnus P. The familial risk of endometriosis [J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 1993, 72(7): 560-564.
- [8] 黄宪章. 雌激素受体基因多态性的研究进展 [J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 2000, 21(6): 254-255.
- [9] Hill SM, Fuqua SA, Chamness GC, et al: Estrogen receptor expression in human breast cancer associated an estrogen receptor gene restriction fragment length polymorphism [J]. Cancer Res, 1989, 49(1): 145-148.
- [10] Kobayashi S, Inoue S, Hosoi T, et al. Association of bone mineral density with polymorphism of the estrogen receptor gene [J]. J Bone Miner Res, 1996, 11(3): 306-311.
- [11] 陈富强, 朱晓平, 钱小虎, 等. 雌激素受体基因多态性与子宫肌瘤的相关研究 [J]. 中国妇产科临床杂志, 2006, 7(4): 290-291.
- [12] 黄琪仁, 王敏红, 张良平, 等. 绝经后健康妇女雌激素受体基因多态性与骨密度关系研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 1998, 4(2): 38-40.
- [13] 富琪, 魏丽惠, 关菁, 等. 雌激素受体基因限制性片段长度多态性与子宫内膜异位症 [J]. 中国妇产科临床杂志, 2001, 33(2): 131-133.
- [14] 宋绿茵, 何凤仪, 方小玲, 等. 雌激素受体基因多态性与子宫内膜异位症的相关性研究 [J]. 中华妇产科杂志, 2005, 40(1): 47-49.
- [15] Wang Z, Yoshida S, Negoro K, et al. Polymorphisms in the estrogen receptor beta gene but not estrogen receptor alpha affect the risk of developing endometriosis in a Japanese population [J]. Fertil Sseril, 2004, 81: 1650-1656.
- [16] Oehler MK, Greschik H, Fischer DC, et al. Functional characterization of somatic point mutations of the human estrogen receptor alpha (hERalpha) in adenomyosis uteri [J]. Mol Hum Reprod, 2004, 10: 853-860.