

子宫内膜异位症与雌激素受体 α 基因多态性之间的相关性

陈继龙¹, 何帮顺², 潘玉琴², 王书奎²

(1. 东南大学临床医学院, 江苏南京 210009; 2. 南京医科大学附属南京第一医院中心实验室, 江苏南京 210006)

[摘要] 目的 探讨雌激素受体 α (estrogen receptor, ER α)基因多态性与子宫内膜异位症(endometriosis, EMs)发生的关系, 从而了解EMs的发病因素, 为疾病的早期诊断及预防提供实验依据。方法 选取214例经手术及病理检查确认为EMs的患者作为观察组, 选取健康体检者160例作为正常对照组。采用分子生物学的方法分析ER α 的Pvu I、Xba I酶切位点限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP), 观察ER α 基因多态性在观察组与对照组中的基因型分布。采用PCR-RFLP的方法分析雌激素受体的多态性。RFLP用Pp(Pvu I)和Xx(Xba I)来表示。结果 Xba I多态性在观察组与对照组中的分布存在显著性差异($P=0.002$)。观察组X等位基因频率为26.17%, 对照组为18.75%, 两组间频率比较有显著性差异($P=0.002$); x等位基因频率为73.83%, 对照组为81.25%, 两组间频率比较有显著性差异($P=0.002$)。其中X与x的比值比(OR)值为2.25(95%可信区间1.56~3.23)。Pvu I多态性在两组间分布比较, 无显著性差异($P=0.081$), 两组P与p等位基因频率分布比较, 亦无显著性差异($P=0.069$)。结论 观察人群中X等位基因与EMs发病危险密切相关。

[关键词] 雌激素受体; 子宫内膜异位症; 基因多态性

中图分类号: R711.71 文献标识码: A 文章编号: 1672-271X(2008)04-0267-04

Association of gene polymorphisms of estrogen receptor alpha with endometriosis

CHEN Ji-long¹, HE Bang-shun², PAN Yu-qin², WANG Shu-kui² (1. Clinical Medical School of Southeast University, Nanjing 210009, Jiangsu, China; 2. Central Laboratory of Nanjing First Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective** To explore the association of gene polymorphisms of estrogen receptor with endometriosis, and provide the clues for early treatment after understanding of etiology of endometriosis. **Methods** 214 patients with endometriosis pathologically diagnosed after operation, and 160 controls were enrolled into this study. PCR-RFLP with restriction enzyme Pvu I and Xba I was performed to identify the gene polymorphisms of estrogen receptor alpha, and the correlations of estrogen receptor alpha with endometriosis were then analyzed. **Results** There was a significant difference between patients and controls ($P=0.002$) in the Xba I polymorphism. The frequencies of allele X were 26.17% and 18.75%, and x were 73.83% and 81.25% in patients and controls respectively. The frequencies of allele X and x were significantly different between patients and controls ($P=0.002$). Compared with x, X allele had a higher OR value of 2.25 (95% CI between 1.56~3.23). There is no significant difference in Pvu I polymorphism ($P=0.081$), and no significant difference in the frequencies of P and p alleles between the patients and controls ($P=0.069$). **Conclusion** X allele is closely associated with a risk of occurrence of endometriosis.

[Key words] Estrogen receptor; Endometriosis; Gene polymorphism

基金项目: 南京市科技发展计划项目(200502019)

作者简介: 陈继龙(1976-), 男, 安徽宣城人, 在读硕士研究生, 从事临床检验诊断学专业。

子宫内膜异位症(endometriosis, EMs)是育龄妇女的一种多发病和常见病,其发病率有逐年增加的趋势。雌激素通过与雌激素受体(estrogen receptor, ER)结合,激活靶细胞内调节基因的表达而产生生物学效应。目前已知ER基因有多种多态性,有报道显示ER基因多态性与骨质疏松症和流产有关^[1-2]。现有研究表明EMs发病有遗传倾向^[3-4],可能在遗传及环境因素的共同作用下发病。已有研究表明ER基因多态性在不同种族、地区间的分布均有差异,而其与EMs的相关性研究结论不一^[5-7]。本文采用用限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)的方法,研究ER α 基因多态性在我国妇女EMs患病组与对照组中的分布情况,旨在探讨ER α 基因多态性与EMs的关系,深入了解本病病因及有关发病因素,以期有效地提高确诊率。

1 对象与方法

1.1 对象

1.1.1 观察组 选取2005年2月至2007年10月于南京市第一医院治疗的经手术后病理确认为EMs患者214例,年龄为23~70岁,平均42.85岁。

1.1.2 对照组 选取2007年8月~2007年10月于南京市第一医院体检的健康体检者160例,年龄为20~62岁,平均32.03岁,入选者均未发现与EMs相关的临床症状。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂和仪器 DNA聚合酶,dNTPs购自南京凯基生物有限公司;限制性内切酶购自美国Fermentas Life Sciences公司;DNA提取试剂盒购自Gentra公司;PCR仪为美国MJ Research公司PTC-200型。

1.2.2 RFLP分析ER α 基因多态性 ①DNA提取:取新鲜组织3g,经研磨,蛋白酶K 54℃消化过夜。基因组DNA提取采用DNA提取试剂盒,实验方法参考试剂盒说明书。②ER α 基因扩增:包括ER α 基因1号内含子及部分2号外显子共1.3 kb。引物序列(上游引物:5'-CTGCCACCCTATCTGTATC-TTTTCCTATTCTCC-3',下游引物5'-TCTTTCT-CTGCCACCCTGGCGTCGATTATCTGA-3')由上海Invitrogen有限公司合成。PCR反应条件:变性94℃、30 s,退火55℃、40 s,延伸72℃、90 s,共30个循环。③ER α 基因酶切消化及检测:PCR扩增产物用限制性内切酶PvuⅡ和XbaⅠ消化(按说明书操

作)。产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳,检测PvuⅡ和XbaⅠ的多态性。RFLP分析的结果用P或p和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。

1.3 统计学处理 应用SPSS 10.0统计软件包进行统计学处理,X和P基因型的数据用卡方检验和趋势卡方检验进行分析。

2 结果

ER α 等位基因的分析:ER α 基因经扩增产物为1.3 kb片段,PvuⅡ酶切可区分出3种基因型(见图1):PP型(终产物仅为1.3 kb大小的1个条带),Pp型(终产物为1.3 kb、850 bp、450 bp大小的3个条带),pp型(终产物为850 bp、450 bp大小的2个条带)。使用XbaⅠ进行酶切可以区分出3种基因型(见图2):XX型(1.3 kb的1个条带),Xx型(1.3 kb、910 bp、390 bp的3个条带),xx型(910 bp、390 bp的2个条带)。以上大写字母均表示存在点突变而使该酶切位点消失,小写字母表示存在该酶切位点。

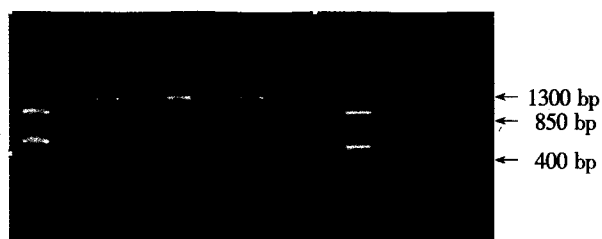


图1 ER α 扩增产物经PvuⅡ酶切后的电泳图

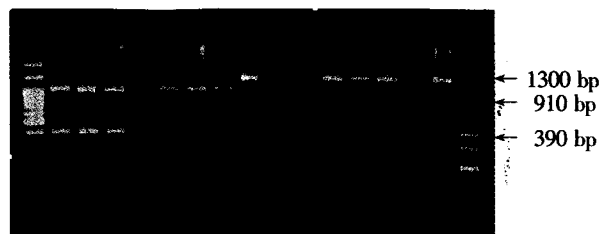


图2 ER α 扩增产物经XbaⅠ酶切后的电泳图

统计结果表明,XbaⅠ多态性在观察组与对照组中的分布比较有显著性差异($P=0.002$),而PvuⅡ多态性在两组间分布比较则无显著性差异($P=0.081$)。观察组X等位基因频率为26.17%,对照组为18.75%,两组间频率比较有显著性差异($P=0.002$);观察组x等位基因型频率为73.83%,对照

组为81.25%，两组间频率比较有显著性差异($P=0.002$)。其中X与x的比值比(OR)值为2.25(95%可信区间1.56~3.23)。两组P与p多态性分布比较则无显著性差异($P=0.069$)。见表1、表2。

3 讨论

EMs有家族性聚集倾向。研究显示,EMs患者一级亲属的发病率高^[3,4],单卵双胞胎姐妹EMs同患率显著高于非双胞胎姐妹,提示EMs可由许多基因位点的多基因控制,是易受环境等其他因素影响的多

表1 两组ERα基因型分布[例(%)]

基因型	观察组	对照组	P
ERα(Xba I)			
xx	112(52.34)	110(68.75)	0.002
Xx	92(42.99)	40(25.00)	
XX	10(4.67)	10(6.25)	
ERα(Pvu I)			
pp	62(28.97)	64(40.00)	0.081
Pp	122(57.01)	76(47.50)	
PP	30(14.02)	20(12.50)	

表2 两组ERα等位基因分布及风险系数分析[例(%)]

等位基因	观察组	对照组	P	OR(95% CI)
ERα(Xba I)				
x	316(73.83)	260(81.25)	0.002	1.0
X	112(26.17)	60(18.75)		2.25[1.56, 3.23]
ERα(Pvu I)				
p	246(57.48)	204(63.75)	0.069	1.0
P	182(42.52)	116(36.25)		1.30[0.97, 1.75]

基因遗传性疾病。有学者报道,雄激素受体、孕激素受体与ER基因多态性均可能与EMs的发生有关^[8]。目前已知的ER有ERα和ERβ两种亚型。分子遗传学研究表明,人类ERα基因定位于第6号染色体上的q24~q27,共有超过14万个碱基对,其中包括8个外显子和7个内含子^[9]。人ERα基因在1号内含子中有两处常可发生点突变,由于这两处点突变发生在限制性内切酶PvuⅡ和XbaⅠ的识别位点上,于是对ERα基因的扩增片段进行酶切便可以区分出ERα的不同基因型^[10-12]。由于1号内含子中含有增强子、启动子等重要调节序列,因而在其中发生的点突变将有可能影响到ER的表达与功能^[11-13]。因此,人群中不同的ER基因型有可能决定了不同个体间ER的表达与功能上的差异,进而影响到体内雌激素的最终生物学效应。

目前的研究显示,ERα基因PvuⅡ酶切后的基因多态性与EMs的发病相关^[5],亦有相反的研究结果表明PvuⅡ酶切后的基因多态性与EMs的发病无相关性^[6]。本研究显示,ERα基因PvuⅡ酶切后的多态性在EMs组与对照组间的分布差异无统计学意义,表明其与EMs的发病无明显相关性,未能证实ERα等位基因P、p与EMs的遗传易感性有关。

近年来对ERα-XbaⅠ的多态性与EMs的关系鲜有报道,本研究发现ERα-XbaⅠ的多态性与EMs的发生密切相关($P=0.002$)。X等位基因的发病风

险是x等位基因的2.25倍。Mizunuma等^[14]研究表明Xx基因型与高骨密度相关,Xx基因型对雌激素水平更加敏感,同时山丹等^[15]对于子宫内膜癌的研究结果表明,ERα-XbaⅠ的多态性与子宫内膜癌的发生密切相关。然而Renner等^[16]和Kim等^[17]分别对德国人和韩国人的研究发现,ERα-XbaⅠ的多态性与EMs没有相关性。这些矛盾的结果可能的原因是不同的种族人群ER基因多态性会有所差异。

本研究表明,ERα基因X等位基因是EMs的发病危险因素之一,而ERα-PvuⅡ多态性与EMs的发生没有明显的相关性。此可为临床工作中EMs的筛查和预后提供参考,以期提高确诊率。

参考文献

[1] 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.
[2] Taylor JA, Wilcox AJ, Bowes WA, et al. Risk of miscarriage and a common variant of the estrogen receptor gene [J]. Am J Epidemiol, 1993, 137(12): 1361-1364.
[3] Kennedy S, Mardon H, Barlow D. Familial endometriosis [J]. J Assist Reprod Genet, 1995, 12(1): 32-34.
[4] Moen MH, Magnus P. The familial risk of endometriosis [J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 1993, 72(7): 560-564.
[5] 傅薇, 林金芳, 朱铭伟, 等. 子宫内膜异位症患者雌激素受体基因的多态性研究 [J]. 中华妇产科杂志, 2002, 37(11): 695-696.

- [6] 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腺异位症[J]. 北京大学学报,2001,33(2): 131.
- [7] 宋绿茵,何凤仪,方小玲,等. 雌激素受体基因多态性与子宫内腺异位症的相关性研究[J]. 中华妇产科杂志,2005,40(1): 47-48.
- [8] Wieser F, Schneeberger C, Tong D, et al. PROGINS receptor gene polymorphism is associated with endometriosis[J]. Fertil Steril, 2002,77(2): 309-312.
- [9] Ponglikitmongkol M, Green S, Chambon P. Genomic organization of the human oestrogen receptor gene[J]. EMBO J, 1988,7(11): 3385-3388.
- [10] Castagnoli A, Maestri I, Bernardi F, et al. Pvu II RFLP inside the human estrogen receptor gene[J]. Nucleic Acids Res, 1987, 15(2): 866-873.
- [11] Ushiyama T, Ueyama H, Inoue K, et al. Estrogen receptor gene polymorphism and generalized osteoarthritis[J]. J Rheumatol, 1998,25(1): 134-137.
- [12] Carling T, Rastad J, Kindmark A, et al. Estrogen receptor gene polymorphism in postmenopausal primary hyperparathyroidism[J]. Surgery, 1997,122(6): 1101-1105.
- [13] Hill SM, Fuqua SA, Chamness GC, et al. Estrogen receptor expression in human breast cancer associated with an estrogen receptor gene restriction fragment length polymorphism[J]. Cancer Res, 1989,49(1): 145-148.
- [14] Mizunuma H, Hosoi T, Okano H, et al. Estrogen receptor gene polymorphism and bone mineral density at the lumbar spine of pre- and postmenopausal women[J]. Bone, 1997,21(5): 379-383.
- [15] 山丹,郭燕燕,鄂文. 雌激素受体基因多态性与子宫内腺癌的关系[J]. 中华妇产科杂志,2003,38(9): 576-577.
- [16] Renner SP, Strick R, Oppelt P, et al. Evaluation of clinical parameters and estrogen receptor alpha gene polymorphisms for patients with endometriosis[J]. Reproduction, 2006,131(1): 153-161.
- [17] Kim SH, Choi YM, Jun JK, et al. Estrogen receptor dinucleotide repeat polymorphism is associated with minimal or mild endometriosis[J]. Fertil Steril, 2005,84(3): 774-777.

(收稿日期:2008-04-29)

(本文编辑:黄攸生; 英文编辑:王建东)

(上接第266页)折修复,缩小眶腔容积是眼座植入术后上睑区凹陷复发的主要原因。

爆裂性眶骨折多发生于眶内壁和眶下壁,如眼球未破裂,临床表现为眼球后退、眼球运动障碍及复视等。同样,对伴有眶内、下壁骨折眼球缺失的病例,仅行义眼座植入术,术后必然出现眼座后退、上睑区凹陷复发。上睑区凹陷虽然可以通过二期手术矫正,但二期手术,不仅增加了患者精神及经济负担,而且由于软组织移位、嵌顿时间长,组织萎缩及纤维化,必然影响眼座的活动度。

眶内下壁骨折临床多采用内、下壁分别放置骨片的方法修复^[4],但为了矫正眼座内陷及移位,术前应计算眶腔扩大的容积,推算眶内填置物的多少,有时可能需要在骨折壁填数层骨片,因此增加了植入物移位及排出风险,而且植入物过多,亦影响眼座活动度。本组病例采用的内下壁骨膜下放置大片骨片的整体修复,具有以下优点,一是恢复眼眶中后部正常三边形状和功能,二是整体骨片将眶内容整体向外上移位并缩小眶腔,可明显解决可能需要数层骨片才能解决的眼球内陷问题,三是整体骨片置于内壁骨折的上缘和下壁骨折的外缘,填置物用量少^[5]。虽然整体修复较常规手术修复稍复杂,手术中要求彻底还纳眶内下壁移行处嵌顿的软组织,但由于是一期手术,眶内切口,患者眼球已摘除,眶内操作空间明显增大,无损害视力及泪道系统之担忧,因此手术操作相对容易。骨片位于眶骨膜下,位置稳定,无需特殊固定。本组病例无植入物移位及排出。部分病例术后CT复查示骨片位置好。

行眼眶内、下壁骨折整体修复,由于骨片象桥一样置于内下壁骨折之间,骨片将眶内软组织向外上方推移,眶腔容积缩小的比例与整体骨片的弯曲度相关,弯曲度越小,即内下壁夹角呈钝角,眶腔容积缩小越大。另外,骨片置入越靠眶尖,眼座突出度越好。本组2例残留上睑区凹陷,术后复查眼眶CT显示,骨片内下壁夹角小,眼座位置相对偏后。如何预防此类并发症,我们在置入眼座之前,先用直径20mm的钢球放入肌锥腔,一方面可以扩大肌锥腔,方便眼座植入,更重要的是根据钢球置入后,上睑饱满度,调整骨片的弯曲度,并决定眼座预置线位置。而且此种方法,术前没必要精确计算眶容积扩大量,应置入物量的多少。

参考文献

- [1] 宋斗,苏书,孙桂珍,等. 高密度聚乙烯眶内填充矫正义眼座置入后上睑凹陷[J]. 中华医学美容杂志,2002,8(2): 80-82.
- [2] 徐乃江. 眼整形美容手术[M]. 上海:上海科技教育出版社,2007: 285-286.
- [3] 范先群,沈勤,李海生,等. 眼眶爆裂性骨折伴眼球内陷的眼眶容积测量[J]. 中华眼科杂志,2002,38(3): 39-41.
- [4] 姜倩钰,周健,郭涛,等. 内壁合并下壁眼眶爆裂性骨折Medpor修复[J]. 眼外伤职业眼病杂志,2004,26(2): 101-102.
- [5] 肖利华,王毅,杨新吉,等. 眼眶内下壁爆裂性骨折整体修复29例[J]. 眼科,2006,15(5): 348-350.

(收稿日期:2008-03-11)

(本文编辑:黄攸生)