文章编号:1000-5404(2010)09-0979-03

论著

PTEN ⅣS4基因多态性与子宫内膜异位症发病风险的关系

张晓燕,王红静,贾西彪 (610041 成都,四川大学华西第二附属医院妇科)

[摘要] **目的** 探讨PTEN ⅣS4基因多态性与子宫内膜异位症(endometriosis,EMS)的关系。**方法** 应用聚合酶链反应-限制性内切酶片段长度多态性(PCR-RFLP)技术,分析86例子宫内膜异位症患者及64例对照者的PTEN ⅣS4基因多态性。**结果** 病例组及对照组PTEN ⅣS4基因野生型(-/-)、杂合型(-/+)、突变型(+/+)频率分别为11.6%、83.7%、4.7%及10.9%、73.5%、15.6%,等位基因-、+频率分别为53.5%、46.5%及47.7%、52.3%,2组比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。合并PTEN ⅣS4基因杂合型(-/+)和野生型(-/-)与突变型(+/+)相比,携带PTEN ⅣS4突变型基因(+/+)可降低子宫内膜异位症的发病风险($OR=3.796$,95% $CI=1.132\ 8\sim12.722\ 7$,$P<0.05$)。**结论** PTEN ⅣS4基因多态性中,突变型基因(+/+)是子宫内膜异位症发生的保护性因素。

[关键词] PTEN基因;子宫内膜异位症;基因多态性
[中图法分类号] R711.71;R394.3 **[文献标志码]** A

Correlation between PTEN ⅣS4 gene polymorphisms and risk of developing endometriosis

Zhang Xiaoyan, Wang Hongjing, Jia Xibiao (Second Affiliated Hospital of Sichuan University, Chengdu, Sichuan Province, 610041, China)

[Abstract] **Objective** To study the correlation between PTEN gene polymorphisms and endometriosis (EMS). **Methods** PTEN ⅣS4 polymorphisms in 86 EMS patients and 64 healthy controls were analyzed by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). **Results** The frequency of wild PTEN ⅣS4 (-/-), heterozygous PTEN ⅣS4 (-/+), and mutant PTEN ⅣS4 (+/+) was 11.6%, 83.7%, 4.7% respectively in EMS patients and 10.9%, 73.5%, 15.6% respectively in healthy controls. The frequency of alleles (- and +) was 53.5% and 46.5% respectively in EMS patients and 47.7%, 52.3% respectively in controls ($P>0.05$). The risk of developing EMS was lower in patients carrying mutant PTEN ⅣS4 (+/+) than in those carrying wild PTEN ⅣS4 (-/-), heterozygous PTEN ⅣS4 (-/+) and mutant PTEN ⅣS4 (+/+) ($OR=3.796$, 95% $CI=1.132\ 8$ to $12.722\ 7$, $P<0.05$). **Conclusion** Mutant PTEN ⅣS4 (+/+) can reduce the risk of developing EMS.

[Key words] PTEN gene; endometriosis; polymorphism

Corresponding author: Wang Hongjing, E-mail: whjscdx@163.com

PTEN是迄今发现的第一个具有磷酸酶活性的抑癌基因,与多种肿瘤包括子宫内膜异位症恶变的发生密切相关[1]。该基因第四内含子存在一个5个碱基(ATCTT)的插入性多态,其位置的特殊,可能造成剪切错误而影响基因表达,从而导致肿瘤发病风险的改变。子宫内膜异位症(endometriosis,EMS)是指有活性的子宫内膜组织(腺体和间质)出现在子宫内膜以外的部位。虽为良性病变,却具有类似恶性肿瘤的种植、侵蚀及远处转移能力。该病具有遗传倾向,研究表明与多种基因及其多态性相关[2]。到目前为止,PTEN基因多态性与肿瘤的相关性研究较多,而与子宫内膜异位症的相关性研究才处于探索阶段。国内外的文献中尚少PTEN ⅣS4基因多态性与子宫内膜异位症的相关性研究报道。

[通信作者] 王红静,E-mail:whjscdx@163.com

本研究采用病例-对照研究方法,以聚合酶链反应-限制性内切酶片段长度多态性(PCR-RFLP)技术进行基因分型,旨在找出PTEN ⅣS4基因多态性与子宫内膜异位症发病风险的关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选择2009年3-6月在四川大学华西第二附属医院妇科住院手术,术后病检证实为EMS,并排除肿瘤性及遗传性疾病史的患者86例作为病例组,平均年龄35.4岁;同期因输卵管阻塞继发不孕及宫外孕手术,术后排除EMS,病史中无肿瘤性及遗传性疾病史的患者64例作为对照组,平均年龄35.6岁。

1.2 标本的采集

均征得病例组及对照组患者或家属的同意后,无菌操作下抽取患者肘静脉血2~3 ml,存放于EDTA-K^+抗凝管中,4 ℃冰箱保存,1周内提取外周血白细胞DNA。

1.3 DNA的提取

用微量全血基因组DNA提取试剂盒(购自北京博大泰克),提取全基因组DNA:将300 μl抗凝全血移入1.5 ml EP管中,加入等体积红细胞裂解液,来回颠倒数次混匀,8 000×*g*离心1.5 min,弃上清,沉淀用300 μl红细胞裂解液再次悬浮,10 000×*g*离心1 min,弃尽上清。分别取100 μl TE将白细胞重新悬浮,加入100 μl裂解液和20 μl RNaseA/蛋白酶K,充分振荡混匀,55 ℃温浴30 min。加入10 μl 3MnaAC(pH=4.8),加入1 250 μl结合缓冲液,充分振荡混匀,10 000×*g*离心5 min,将上清吸入吸附柱,放置1 min,10 000×*g*离心1 min,弃掉废液。加入600 μl漂洗液,10 000×*g*离心1 min,重复洗1次,12 000×*g*离心3 min。将吸附柱套入干净的EP管,各加入30 μl ddH_2O洗脱,-20 ℃保存24 h。将所提DNA进行Agarose电泳。

1.4 PTEN Ⅳ S4位点基因分型

采用PCR-RFLP方法将PTEN Ⅳ S4位点基因分型。PCR上游引物5′-GGGGGTGATAACAGTATCTA-3′,下游引物5′-CTTTATGCAATACTTTTTCCTA-3′(上海生工合成)。PCR反应体系50 μl,其中模板DNA 100 ng(1 μl),10×Buffer 5 μl,dNTPs 5 μl,$MgSO_4$ 2 μl,KOD-Plus 1 μl,ddH_2O 32 μl,上下游引物各2 μl。PCR反应条件:94 ℃预变性5 min;然后94 ℃变性30 s,58 ℃退火45 s,72 ℃延伸1 min,35个循环后,72 ℃继续延伸5 min。PCR产物经过DNA纯化(上海生工PCR纯化试剂盒)后-20 ℃保存。纯化PCR产物加入限制性内切酶*Afl* Ⅱ(New England Biolabs)于37 ℃酶切过夜,行2.5%琼脂糖凝胶电泳后,凝胶成像仪下观察判断基因型。每一次PCR反应均以双蒸水替代DNA作为阴性对照。为了保证结果的可靠性,将10%的标本进行二次分型,其结果均与原基因分型结果完全符合。

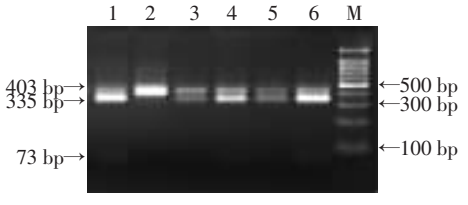
1.5 统计学处理

数据用SPSS 13.0软件进行统计学分析,对基因型频率的观察值与预期值比较进行χ^2检验行Hardy-Weinberg平衡分析。病例组与对照组的基因型、等位基因型分布比较均采用χ^2检验。以非条件Logistic回归法计算表示相对风险度的比值比(odds ratio,*OR*)及其95%可信区间(95% confidence interval,95% *CI*)。

2 结果

2.1 PTEN基因扩增产物*Afl* Ⅱ酶切电泳结果

PTEN基因第四内含子插入5个碱基,从而产生1个*Afl* Ⅱ限制性酶切位点。因此经限制性内切酶消化后,PTEN野生(Ⅳ S4非插入,-/-)纯合型产生一个单独的403 bp片段,PTEN突变(Ⅳ S4插入5 bp,+/+)纯合型则产生335 bp和73 bp 2个DNA片段,而PTEN杂合型(-/+)产生403、335、73 bp 3个片段(图1)。突变型(+/+)插入的5个碱基是ATCTT(PTEN SNP数据库 http://www.ensemblOrg/Homo_Sapiens/Snpview?snp=rs3830675)。



1:+/+基因型;2:-/-基因型;3~6:-/+基因型;M:100 bp DNA ladder

图1 PTEN基因扩增产物*Afl* Ⅱ酶切电泳结果

2.2 PTEN Ⅳ S4多态位点的基因型频率分布

病例组及对照组PTEN Ⅳ S4基因型分布均符合Hardy-Weinberg平衡($P>0.05$),表明所选样本具有群体代表性。病例组及对照组PTEN Ⅳ S4基因野生型(-/-)、杂合型(-/+)、突变型(+/+)频率分别为11.6%、83.7%、4.7%及10.9%、73.5%、15.6%($\chi^2=5.239$,$P>0.05$),等位基因-、+频率分别为53.5%、46.5%及47.7%、52.3%($\chi^2=1.00$,$P>0.05$),2组比较差异无统计学意义(表1)。

表1 病例组与对照组PTEN Ⅳ S4基因型频率及等位基因频率分布[例数(%)]

组别	*n*	-/-	-/+	+/+	-	+
病例组	86	10(11.6)	72(83.7)	4(4.7)	92(53.5)	80(46.5)
对照组	64	7(10.9)	47(73.5)	10(15.6)	61(47.7)	67(52.3)

2.3 PTEN基因型分布与EMS发病风险相关性分析

突变型(+/+)与合并PTEN Ⅳ S4基因杂合型(-/+)和野生型(-/-)相比,病例组与对照组差异有统计学意义($P<0.05$)。表明PTEN Ⅳ S4基因多态性中,突变型(+/+)可能降低子宫内膜异位症的发病风险,*OR*值为3.796(95% *CI*=1.132 8~12.722 7)。

3 讨论

3.1 子宫内膜异位症与PTEN的关系

PTEN是1997年发现的一种肿瘤抑制基因,其位于染色体10号q23.3区,它包含9个外显子和8个内含子,全长200 kb。它最突出特点是具有蛋白磷酸酶和脂质磷酸酶活性的双重特异性磷酸酶。其蛋白磷酸酶活性表现为:去除其他蛋白质酪氨酸残基上连接的磷酸基团,对细胞增殖起负性调控作用;使由纤维粘连蛋白介导的灶性粘连蛋白(FAK)的磷酸化水平降低而抑制其活性,影响细胞间及细胞内外基质的相互作用,对细胞的粘连进行负调节,从而调节肿瘤细胞的浸润和转移;降低有丝分裂原激活蛋白激酶(MAPK)磷酸化水平,对MAPK途径进行抑制,从而抑制肿瘤的生长和增殖[2,3]。脂质磷酸酶活性可以使磷酸肌醇通路的脂质脱磷酸,干扰PI3K(磷酸肌醇激酶)/AKT(苏氨酸激酶)信号通路,使细胞阻滞于G_1期,并增加细胞对凋亡的敏感性[4,5]。PTEN的功能异常主要通过等位基因缺失、基因突变、甲基化、表达缺失等方式发生。PTEN的突变、缺失及多态性等与多种肿瘤的发生发展密切相关。

子宫内膜异位症是育龄妇女常见的妇科疾病之一,发病率高达10%~15%。子宫内膜异位症的病因及发病机制至今尚未完全明了。子宫内膜异位症虽是一种良性病变,却具有侵袭、种植等生物学行为,与恶性肿瘤极其相似,而且有0.5%~1.5%恶变率。基于子宫内膜异位症的恶性生物学行为及PTEN基因通过不同方式调控细胞周期、抑制细胞增殖及诱导凋亡,从而抑制肿瘤的发生及发展的功能,PTEN与子宫内膜

异位症的相关性研究已成为子宫内膜异位症病因研究中的一大热点。

陈迎秀等[6]的研究发现,PTEN在子宫内膜增生期、增生过长、不典型增生及内膜癌组织中的阳性表达总体呈显著递减,随着组织学分级、手术病理分期及肌层浸润深度的增加,PTEN阳性率均降低。Sato等[7]则分别在20例子宫内膜样癌、24例透明细胞癌及34例卵巢子宫内膜异位症中检测PTEN基因的突变,发现三者的PTEN突变率分别为20.0%、8.3%、20.6%。而且在子宫内膜异位症来源的肿瘤中,多数在子宫内膜异位症部分和癌组织中可检出PTEN突变,推测PTEN基因失活可能是卵巢子宫内膜样癌及透明细胞癌发生的早期事件,亦可能是卵巢子宫内膜异位症恶变的机制。周勤等[8]研究也表明PTEN在子宫内膜癌的早期发病中起重要作用。李艳等[9]研究发现,PTEN在正常子宫内膜中为高表达(92.5%),在异位内膜中的表达水平明显降低(37.8%),而PTEN在子宫内膜异位症在位内膜中的表达(68.9%)介于正常内膜与异位内膜之间,两两比较差异有统计学意义($P<0.05$);表明PTEN表达降低和缺失可能是子宫内膜异位症发生、发展的机制之一。造成PTEN表达降低和缺失的原因除了可能与PTEN基因突变、表达缺失及甲基化有关外,是否与PTEN基因多态性有关目前尚不清楚。本研究的目的在于探讨子宫内膜异位症与PTEN基因多态性的相关性。

3.2 子宫内膜异位症与PTEN Ⅳ S4基因多态性的相关性

PTEN基因多态与多种疾病具有相关性,在其已确认的多态性位点中,有3个最常见。其中1个位于第1外显子,5′UTR区,-9C/G SNP;另2个位于内含子区,第4内含子(Ⅳ S4)的插入性多态和第7内含子(Ⅳ S7)的缺失性多态。第4内含子5 bp(ATCTT)插入性多态(Ⅳ S4 -/+),由于其位置距剪切位点较近,可能造成剪切错误或者与其他位点连锁来影响PTEN功能。PTEN Ⅳ S4基因多态性与子宫内膜异位症的相关性研究,国内外尚少见报道。本研究结果显示:对照组PTEN基因Ⅳ S4基因型野生型(-/-)、杂合型(-/+)、突变型(+/+)频率分别为10.9%、73.5%、15.6%,这与国外研究结果中基因型分布存在显著差异[10],表明在不同种族中PTEN Ⅳ S4多态性分布可能不同。本研究病例组及对照组PTEN基因Ⅳ S4基因型频率分布在2组比较差异均无统计学意义($P>0.05$),这与国外报道一致[10]。在合并PTEN Ⅳ S4基因杂合型(-/+)和野生型(-/-)后与突变型(+/+)相比,病例组与对照组差异有统计学意义($P<0.05$),表明PTEN Ⅳ S4基因多态性中,突变型(+/+)可能降低子宫内膜异位症的发病风险,这与Ⅳ S4 -/+基因型降低食管癌的发病风险的报道一致[11],但与Ⅳ S4 +/+基因型可增加较年轻者患乳腺癌风险的报道不同[12]。而Treloar等[13]在一项澳大利亚人关于子宫内膜异位症与PTEN基因多态性研究中发现,纳入研究的rs2673836、rs1234220、rs1234219、rs2299939、rs11202597、rs1234213、rs1234224、rs2735343、rs17431184、rs2736627、rs926091、rs532678、rs1903858、rs555895、rs9651492、rs701848和rs478839共17个PTEN的基因多态性位点均与澳大利亚妇女子宫内膜异位症无相关性。由此可以认为在不同类型肿瘤中,PTEN Ⅳ S4多态性发挥不同的作用,同时也存在不同人群中这一多态对肿瘤易感性的差异的可能性。因此有必要在某一确定的人群中进行不同类型疾病的研究,来评价PTEN Ⅳ S4多态性的作用。

参考文献:

[1] Li J, Yen C, Liaw D, *et al*. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer[J]. Science, 1997, 275(5308): 1943-1947.

[2] Ji S P, Zhang Y, Van Cleemput J, *et al*. Disruption of PTEN coupling with 5-HT2C receptors suppresses behavioral responses induced by drugs of abuse[J]. Nat Med, 2006,12(3): 324-329.

[3] Leslie N R, Yang X, Downes C P, *et al*. PtdIns(3,4,5)P(3)-dependent and -independent roles for PTEN in the control of cell migration[J]. Curr Biol, 2007, 17(2): 115-125.

[4] Salmena L, Carracedo A, Pandolfi P P. Tenets of PTEN tumor suppression[J]. Cell, 2008, 133(3): 403-414.

[5] Chalhoub N, Baker S J. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer [J]. Annu Rev Pathol, 2009, 4: 127-150.

[6] 陈迎秀, 王学芳. PTEN及p53蛋白在不同类型子宫内膜组织中的表达及意义[J]. 实用临床医药杂志, 2009, 13(6): 91-92.

[7] Sato N, Tsunoda H, Nishida M, *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[J]. Cancer Res, 2000, 60(24): 7052 7056.

[8] 周勤, 刘睿倩. PTEN在子宫内膜腺癌中的表达及其临床意义[J]. 重庆医科大学学报, 2008, 33(2):186-188.

[9] 李艳,陈琼霞,沈延春,等. 抑癌基因PTEN在子宫内膜异位症中的表达及意义[J]. 中外医疗, 2009, 28(25): 151-152,155.

[10] George D J, Shepard T F, Ma J, *et al*. PTEN polymorphism (Ⅳ S4) is not associated with risk of prostate cancer[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2001, 10(4): 411-412.

[11] Ge H, Cao Y Y, Chen L Q, *et al*. PTEN polymorphisms and the risk of esophageal carcinoma and gastric cardiac carcinoma in a high incidence region of China[J]. Dis Esophagus, 2008, 21(5): 409-415.

[12] Carroll B T, Couch F J, Rebbeck T R, *et al*. Polymorphisms in PTEN in breast cancer families [J]. J Med Genet, 1999, 36(2): 94-96.

[13] Treloar S A, Zhao Z Z, Le L, *et al*. Variants in EMX2 and PTEN do not contribute to risk of endometriosis[J]. Mol Hum Reprod, 2007, 13(8): 587-594.

(**收稿**:2009-10-25;**修回**:2009-11-26)
(编辑 栾 嘉)