维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)10-1045-04

雌激素受体β基因CA重复序列多态性与原因不明月经过少的关系

乐爱文[1],袁 瑞[1],夏恩兰[2],耿 力[1],周晓曦[1],姚珍薇[1]

(1. 重庆医科大学附属第一医院妇产科,重庆 400016;2. 首都医科大学附属复兴医院宫腔镜中心,北京 100038)

【摘 要】目的:研究雌激素受体β(Estrogen receptorβ,ERβ)基因CA重复序列多态性与原因不明月经过少关系。方法:选择西南地区的100名月经正常人作为正常对照组,100名原因不明月经过少患者作为病例组。同时对人ERβ基因5号内含子的高变区CA重复序列进行纯化、克隆和序列分析,阐明该CA重复序列多态性在实验组与对照组当中的分布情况及与原因不明月经过少的关系。结果:共分离出9种等位基因,其(CA)n重复数目为16~24。正常组和病例组的等位基因的分布频率差异无显著性(χ^2=7.155,P=0.520)。以重复次数$n\leq 20$作为SS型,$n>20$为LL型。SS基因型频率实验组为66%,对照组为51%,OR值:1.865倍(95%CI:1.055~3.298)。再比较两组病人SS型和LL等位基因型的分布频率,差异有显著性(χ^2=4.634,P=0.031)。结论:ERβ基因CA重复序列多态性与原因不明月经过少有关,SS型等位基因型可能是原因不明月经过少的危险因素。

【关键词】月经过少;雌激素受体;二核苷酸(CA)重复序列;等位基因

【中国图书分类法分类号】R711-51 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-03-13

The association of a CA repeat polymorphism in ERβ gene with unknown aetiology hypomenorrhea

LE Aiwen, et al

(*Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the association of a (CA)n dinucleotide repeat polymorphism of ERβ with unknown aetiology hypomenorrhea. *Methods*: We choosed 100 eumenorrhea women as control group and another 100 hypomenorrhea patients as case group from Southwestern China. At the same time, we bring depuration, clone and sequence analysis to CA repeat polymorphism in 5 intron region of estrogen receptor β to illuminate its repeated sequence polymorphism distributing between control and case group and its relationship with unknown aetieological hypomenorrhea. *Results*: We got 9 alleles and the repeated number of (CA) n was 16~24. There was not difference between distributing frequencies of CA repeat polymorphism in control and case groups(χ^2=7.155, P=0.520). SS genotype was defined as repeat number $n\leq 20$, LL for $n>20$. Case group SS genotype rate was 66%, control group 51%, OR=1.865 (95%CI: 1.055~3.298). The SS and LL allele genotypes frequency was compared in two groups and the difference was significant (χ^2=4.634, P=0.031). *Conclusion*: ERβ gene CA repeat polymorphism is related to unknown aetiological hypomenorrhea. SS allele genotype may be the risk factor of unknown aetiological hypomenorrhea.

【Key words】Hypomenorrhea; Estrogen receptor; (CA) Dinucleotide repeat sequence; Allele

临床上发现一类月经过少(经量少于30ml)[1]病人其雌激素水平正常,无内外科及先天性疾病,其被称为原因不明月经过少。研究发现,ER有ERa和ERβ两种亚型。我们前期研究结果显示此类病人ER表达较月经正常妇女下降,且ERa基因多态性在病例与对照组中分布有差别[2]。在ERβ基因5号内含子存在C(cytosine)和A(adenine)重复多态性(D14S1026),由于其重复次数不同与某些与激素水平相关疾病有关[3]。我们研究ERβ基因CA重复多态性在我国西南地区妇女原因不明月经过少组与对照组当中的分布情况,从而探讨ERβ基因CA重复序列多态性与原因不明月经过少关系。

1 材料与方法

作者介绍:乐爱文(1976-),男,主治医师,博士生,主要研究方向:妇科内窥镜及肿瘤。

基金项目:重庆市卫生局科研项目(06-2-059)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 临床资料

选取 2003 年 2 月～2005 年 11 月在我院就诊的原因不明月经过少患者 100 例作为病例组，年龄 20～40 岁，平均 31.5 岁。选取同期的月经量正常因其它疾病而行宫腔镜检查妇女 100 例作为对照组，年龄 20～40 岁，平均 28.4 岁。原因不明月经过少纳入标准：(1)经量少于 30ml，(2)性激素水平检测在正常范围，(3)宫腔镜检查：月经第 5 天子宫内膜光滑菲薄，宫腔无粘连，输卵管开口清晰可见，(4)排除内科疾患如糖尿病、结核病以及甲状腺、肾上腺等内分泌疾病、外科疾病、先天性疾病等，(5)B 超：子宫内膜厚度 <5mm，(6)个体间无血缘关系，(7)检查前 3 月未接受任何性激素治疗。

对照组经量大于 30ml，子宫内膜厚度≥5mm，子宫内膜光滑，其余入选标准同原因不明月经过少。

具体操作内容如下：

1.1.1 月经量估计 连续观察 3 个月经周期，根据月经失血图法[4]计算月经量，以平均月经量少于 30ml，诊断为月经过少。

1.1.2 性激素检查 于卵泡期空腹状态上午 9 时以前抽取静脉血检查。性激素检查方法 采用酶联免疫测定法，药盒为美国 Biocheck 公司生产，测定血清 6 项性激素：包括卵泡刺激素(FSH)、黄体生成素(LH)、雌激素(E2)、催乳素(PRL)、孕酮(P)及睾酮(T)，均在正常范围才入选。

1.1.3 子宫内膜厚度 患者均于月经第 5 天用 B 超声诊断，子宫内膜厚度 <5mm，入选原因不明月经过少。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 采用博富瑞生物工程北京公司的 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA。

1.2.2 DNA 含量的测定 用美国 Beckman 公司的紫外分光光度计测出。

1.2.3 PCR 反应 PCR 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。上游引物：5'ACTCCCTGCCATTGCCATAC 3'，下游引物：5'TCCACCCATCTCAGTCTCCC 3'。基因组 DNA 0.1μg，缓冲液：10mmol/L Tris-HCl(pH=8.0)，50mmol/L KCl，2.5mmol/L $MgCl_2$，体积分数为 1%的 Triton X-100，四种脱氧核苷酸(A,G,C,T)均为 200μmol/L，1U TaqD-NA 聚合酶（华美公司），0.4μmol/L 低聚核苷酸引物。95℃预变性，3min；进入循环：变性 94℃，1min；退火 58℃，1min；延伸 72℃，1min，共 30 个循环。终末延伸 72℃，7min。最后取 PCR 产物 1μl 在含溴化乙锭的 2%琼脂糖凝胶上电泳，鉴定其纯度及完整性，紫外灯下观察并照相。

1.2.4 测序 PCR 扩增产物包括 ERβ 基因包含 CA 重复序列的一段基因，长约 274bp，送上海生工生物工程技术服务有限公司作测序分析。

1.2.5 统计方法 应用拟合优度 χ^2 检验判断两组各基因型分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡。计数资料用 χ^2 检验。比较正常对照组、病例组等位基因的分布频率用 χ^2 检验，以优势比（Odds ratios，OR）及其 95%可信区间(Confidence intervals，CI)表示相对风险度。设定 $P<0.05$ 时差异有显著性。

2 结 果

2.1 ERβ 基因 CA 重复序列琼脂糖凝胶电泳结果

PCR 扩增产物长度为 264~280bp，用 8u1PCR 扩增产物与标准分子量 DL2000（上海生工生物工程技术服务有限公司）一起经 2%琼脂糖凝胶电泳，鉴定扩增效果，在 200bp 与 300bp 之间可见明显的 PCR 扩增条带(见图 1)。

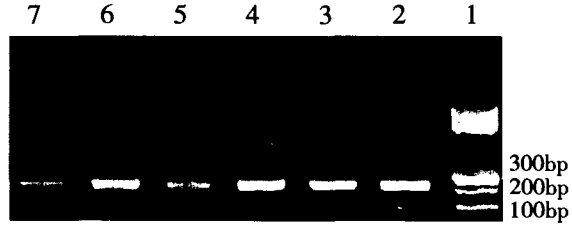


图 1 ERβ 基因 CA 重复序列的 PCR 扩增产物经 2%琼脂糖凝胶电泳，PCR 扩增产物位于分子量标准 200~300 之间。1 道为 DNA marker，2~7 道为样本条带

2.2 ERβ 基因 CA 重复序列测序图

2.3 分 析

实验组和对照组 CA 重复序列等位基因型分布应用拟合优度 χ^2 检验，χ^2 分别为 0.148 和 7.889，P 值分别为 0.700 和 1.000，P 值均>0.05，符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律，具有群体代表性。病例组和对照组 CA 重复序列等位基因的分布率，差异无显著性(χ^2=7.155，P=0.520)(表 1，图 3)。两组均以等位基因 CA20 占比例最大，病例组 22%，对照组 20%，因此以重复次数 $n\leq 20$ 作为 SS 型，$n>20$ 为 LL 型。结果发现病例组 SS 占 66%，LL 占 34%，对照组 SS 占 51%，LL 占 49%，χ^2=4.634，P=0.031。等位基因频率的相对风险分析，SS 等位基因患原因不明月经过少的风险是 LL 等位基因的 1.865 倍(95%CI：1.055~3.298)。

3 讨 论

雌激素是调节月经的主要激素，雌激素是调节月经的主要激素，作用体现在：一方面促进子宫内膜血管的周期性重建；另一方面促进子宫内膜的增生修复[5]。由于雌激素是月经调节的主要激素，其

维普资讯 http://www.cqvip.com

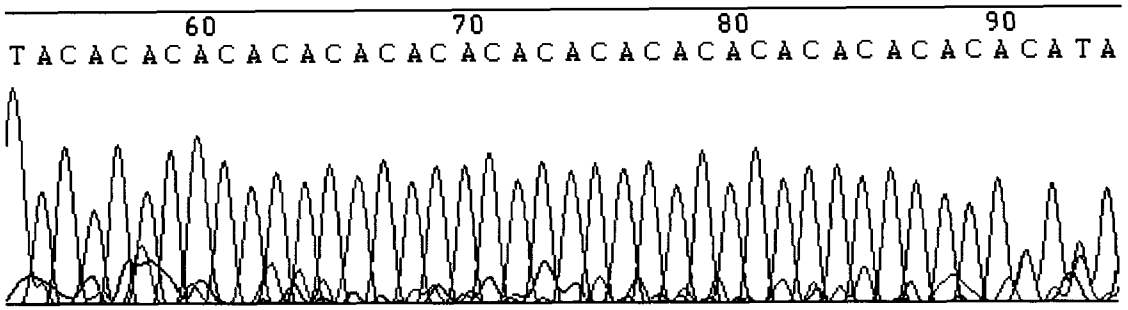


图 2 ERβ 基因 CA 重复片段序列分析,此图示 CA 重复 19 次

表 1 ERβ 基因 CA 重复序列等位基因在两组中分布表

等位基因	病例组	对照组
CA16	2	1
CA17	8	4
CA18	18	11
CA19	16	15
CA20	22	20
CA21	10	13
CA22	13	17
CA23	8	11
CA24	3	8

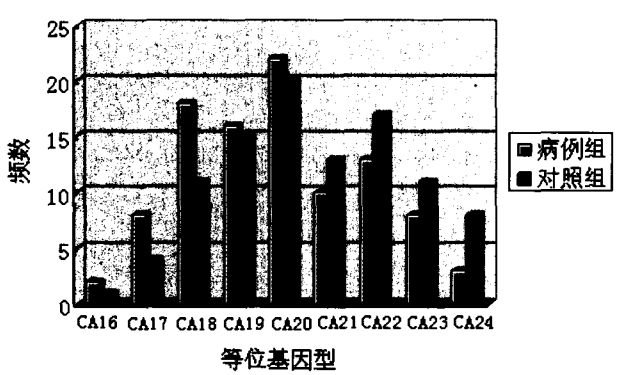


图 3 两组 ERβ 基因 CA 重复序列各种等位基因的分布图

通过与雌激素受体(ER)作用,人体内雌激素靶器官、某些非雌激素靶器官及恶性肿瘤细胞中均存在雌激素受体 (Estrogen receptor,ER),ER 是配体依赖转录活性因子超家族(类固醇激素、甲状腺激素、维生素 D3、维甲酸等受体)成员之一,定位于胞浆或胞核内,具有转录因子的作用,与雌激素结合后即形成二聚体,通过与靶基因中的雌激素反应元件特异性结合,刺激靶基因转录,从而促进细胞增殖和分化。原因不明月经过少是近年来逐渐被人们所关注的一类疾病。ERβ 参与了雌激素对月经周期中子宫内膜的生理调节作用[6],雌激素正常,我们推测可能 ERβ 减少(前期研究结果显示此类病人 ERβ 表达较月经量正常妇女下降),使雌激素对子宫内膜调节作用下降,从而引起月经量的下降。

人 ERβ 基因位于 14 号染色体。其基因多态性与激素依赖性疾病的关系逐渐被关注,其中微卫星(Microsatellite,MS) 或短串联重复序列(Short tandem repeat,STR)多态性(此处表现为 CA 重复序列) 作为第二代遗传标记, 也引起许多学者兴趣。Slattery[7]等人研究证明 ERβ 基因长 CA 重复序列患者得结肠癌风险更高, 并且认为 ERβ 比 ERa 在结直肠癌病因中取更重要作用。Beleza-Meireles[8]通过对 60 个男孩尿道下裂病人研究发现, ERβ 基因长 CA 重复序列更易患尿道下裂。Anghel[9]认为雄激素基因长 CAG、ERa 基因短 TA、ERβ 基因短 CA 重复序列与乳腺癌有关。Takeo[10]认为 ERβ 基因 CA 重复次数与绝经和绝经后症状有关。但国内外尚无对其与原因不明月经过少的研究。

在研究中对中国西南人群的 ERβ 基因 CA 重复序列多态性进行分析,确定 9 种等位基因(n=16~24),两组人群符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律,具有群体代表性。病例组和对照组 CA 重复序列等位基因的分布频率, 差异无显著性 (χ^2=7.115,P=0.520)。研究还发现病例组病 SS 型等位基因频率高于对照组,差异有显著性(χ^2=4.037,P=0.045)。SS 等位基因患原因不明月经过少的风险是 LL 等位基因的 1.865 倍 (95%CI:1.055~3.298)。从而说明 ERβ 基因 CA 重复序列多态性与原因不明月经过少发生有关,SS 型可能增加其患病风险。

关于核苷酸重复序列的产生机制,普遍认为是 DNA 复制过程中滑动, 或 DNA 复制和修复时滑动链与互补链碱基错配,导致一个或几个重复单位的插入或缺失。Valdas 等[11]认为从统计学角度看,其产生采用的是逐步突变模式(Stepwise mutation mod-

维普资讯 http://www.cqvip.com

el,SMM)，即每一次突变均增加一个或数个重复单位,从而导致一个新的等位基因的出现。STR 多态性的功能目前尚不甚明了,但已发现其可能参与遗传物质的结构改变，基因调控及细胞分化等过程,有自身特异性结合蛋白，还能直接编码蛋白质,是一种非常活跃的碱基序列。C 反应蛋白作用位点的内含子二核苷酸重复序列与基因的表达水平有关。其还可以调节局部染色质结构和细胞核基质的粘附，参与某些基因的重组,或者与维系着丝点强度保证染色体三维结构有关,进而影响其表达[12]。定位于非翻译区 CA 重复序列可以影响其基因表达,并且依据一些实验证实短 CA 重复序列与 ERβ 基因活性下降有关[10]。因此我们猜想 SS 型等位基因也可能通过上述几种机制综合作用下调 ERβ 基因表达,使其对月经调节作用下降,进而引起月经过少。

我们结果显示中国西南地区原因不明月经过少病人 ERβ 基因 SS 型等位基因可能是其危险因素,因此拟在下一步对两组 SS 型、LL 型等位基因表达进行研究,从而在基因水平更确切地阐明 ERβ 基因与原因不明月经过少发病的关系。

参 考 文 献

[1] 郑筱萸,主编.中药新药治疗月经不调的临床研究指导原则[M].第 1 版,北京:中国医药科技出版社,2002.239.

[2] 袁 瑞,乐爱文,姚珍薇,等.雌激素受体 α 基因 TA 重复序列多态性与原因不明月经过少的关系[J]. 重庆医科大学学报,2006;31(5):697-700.

[3] Westberg L,Ho HP,Baghaei F,et al.Polymorphisms in oestrogen and progesterone receptor genes:possible influence on prolactin levels in women[J]. Clin Endocrinol (Oxf),2004;61(2):216-223.

[4] 冯力民,夏思兰,丛 捷,等.应用月经失血图评估月经血量[J].中华妇产科杂志,2001;36(1):51.

[5] Jabbour HN,Kelly RW,Fraser HM,et al.Endocrine regulation of menstruation[J]. Endocr Rew,2006;27(1):17-46.

[6] Matsuzaki S,Fukaya T,Suzuki t,et al.Oestrogen receptor alpha and beta mRNA expression in human endometrium throughout the menstrual cycle[J]. Mol HumReprod,1999;5:559-564.

[7] Slattery ML,Sweeney C,Murtaugh M,et al.Associations between ERalpha,ERbeta,and AR genotypes and colon and rectal cancer[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,2005;14(12):2936-2942.

[8] Beleza-Meireles A,Omrani D,Kockum I,et al.Polymorphisms of estrogen receptor beta gene are associated with hypospadias[J]. J Endocrinol Invest,2006;29(1):5-10.

[9] Anghel A,Raica M,Marian C,et al. Combined profile of the tandem repeats CAG,TA and CA of the androgen and estrogen receptor genes in breast cancer[J]. J Cancer Res Clin Oncol,2006;132(11):727-733.

[10] Takeo C,Negishi E,Nakajima A,et al. Association of cytosine-adenine repeat polymorphism of the estrogen receptor-beta gene with menopausal symptoms[J]. Gend Med,2005;2(2):96-105.

[11] Valdes AM,Slatkin M,Freimer NB.Allele frequencies at microsatellite loci:the stepwise utation model revisited[J]. Genetics,1993;133(3):737-749.

[12] Scariano JK,Simplicio SG,Montoya GD,et al. Estrogen receptor beta dinucleotide(CA) repeat polymorphism is significantly associated with bone mineral density in postmenopausal women[J]. Calcif Tissue Int,2004;74(6):501-508.

(上接第 1044 页)

creased tumour necrosis factor alpha (TNF-α) and soluble TNF receptor protein plasma levels after trauma reveals associations with the clinical course[J]. Acta Anaesthesiol Scandinavica,2001;45(3):364-370.

[9] Ono S,Ueno C,Aosasa S,et al. Severe sepsis induces deficient interferon-gamma and interleukin-12 production,but interleukin-12 therapy improves survival in6 eritonitis[J]. Am J Surg,2001;182(5):491-497.

[10] 李文雄,陈惠德,王小文,等.脓毒症患者血清 TNFα、IL-10 水平、IL-10/TNFα 比值的变化及其临床意义[J]. 中华普通外科杂志,2003;18(4):229-231.

[11] Ohmoto K,Yamamoto S. Serum interleukin-6 and interleukin-10 in patients with acute pancreatitis:clinical implications[J]. Hepatogastroenterology,2005;52(64):990-994.

[12] Miyaoka K,Iwase M,Suzuki R,et al. Clinical evaluation of circulating interleukin-6 and interleukin-10 levels after surgery-induced inflammation[J]. J Surg Res,2005;125(2):144-150.

[13] Schwacha MG. Macrophages and post-burn immune dysfunction[J]. Burns,2003;29(1):1-14.

[14] Volk HD,Reinke P,Krausch D,et al. Monocyte deactivation-rationale for a new therapeutic strategy in sepsis[J]. Intensive Care Med,1996;22:S474-S481.