维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2006)05-0459-04

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

袁　瑞，乐爱文，耿　力，周晓曦，姚珍薇

（重庆医科大学附属第一医院妇产科，重庆　400016）

【摘　要】目的：研究雌激素受体 a（estrogen receptor a，ERa）基因二核苷酸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 名月经正常者作为对照组，100 名原因不明月经过少患者为病例组。同时对她们雌激素受体基因上游的高变区二核苷酸（TA）重复序列进行纯化、克隆和序列分析，阐明该重复序列的重复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 7 种等位基因，其（TA）n 重复数目为 11 至 17，对照组中最常见的等位基因为 TA14，正常组和病例组的（TA）n 重复序列等位基因的分布频率不同，差异有显著性（χ^2=13.412，P=0.037）。再用 Fisher's 确切概率法比较两组病人各等位基因的分布频率，病例组 TA13 等位基因频率高于对照组，差异有显著性（P=0.006），TA15 等位基因频率低于对照组，差异有显著性（P=0.033）。结论：ERa 基因 TA 多态性与原因不明月经过少有关，TA13 等位基因可能是原因不明月经过少的危险因素；TA15 等位基因可能是其保护因素。

【关键词】月经过少；雌激素受体；二核苷酸（TA）重复序列；多态性；等位基因

【中国图书分类法分类号】R711.51；Q523+.6　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2006-06-15

The association of a TA repeat polymorphism in ERa gene with unknown aetiology hypomenorrhea

YUAN Rui, et al

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

【Abstract】*Objective*: To investigate the association of a (TA)n dinucleotide repeat polymorphism with unknown aetiology hypomenorrhea. *Methods*: 100 normal menstruation person (control group) and 100 hypomenorrhea patients (case group) were recruited. they all came from southen-western China. The (TA)n dinucleotide repeat in ERa gene upstream hypervariable region were purifed, cloned and sequence analysed. we observe the ERa gene (TA)n dinucleotide repeat polymorphism distribution in the two groups. *Results*: All samples exhibted 7 different alleles. The (TA)n dinucleotide repeats were 11~17, The most prevalent allele was TA14 repeat in control group. The distribution of the different alleles of the (TA)n dinucleotide repeat sequence in the group and control group has significant difference (χ^2=13.412, P=0.037). Fisher's exact test was applied to compare the frequency of each allele between two groups. The frenquency of the TA13 allele was found to be significantly greater in hypomenorrhea group (P=0.006), and the frenquency of the TA15 allele was less in the group (P=0.033). *Conclusion*: A (TA)n dinucleotide repeat sequence which is in ERa gene upstream hypervariable region was associated with unknown aetiology hypomenorrhea. The TA13 allele was found to be associated with unknown aetiology hypomenorrhea and may be a risk factor; whereas TA15 allele may be a protective factor for patients.

【Key words】Hypomenorrhea; Estrogen receptor; (TA) dinucleotide repeat sequence; Polymorphism; Allele

经量少于 30ml，称为月经过少，是妇科常见症状。其危害是影响孕卵在子宫内膜种植，导致反复流产、不孕等，是闭经的前驱症状。雌激素是调节月经的主要激素，但临床上发现一类病人其雌激素水平正常，无内外科及先天性疾病，我们称为原因不明月经过少。同时，我们对大量原因不明月经过少患者进行宫腔镜检查发现，月经过少患者中有许多病员的子宫内膜光滑菲薄，表现为生长发育不良。与传统的子宫内膜损伤、疤痕学说并不吻合。面对大量由此导致的反复流产、不孕症患者，目前临床尚无解决方案。雌激素是通过与雌激素受体(Estro-

作者介绍：袁　瑞(1964-　)，女，副教授，博士生，主要研究方向：妇科内窥镜及肿瘤。

维普资讯 http://www.cqvip.com

gen Receptor,ER)结合而发挥其生物学效应。我们观察到此类病员雌激素水平正常,由此我们自然想到是否雌激素受体环节出现障碍? ERa 基因上游 1kb 存在 T(thymine),A(adenine)重复序列,它属于基因的调控区,对基因表达起调控作用[1]。1995 年有日本学者做了有关 ERa 基因 TA 微卫星的重复序列多态性与日本妇女骨质疏松的相关性的研究,TA 的 12 次重复在日本妇女的骨质疏松症有特异性[2]。我们研究 ERa 基因 TA 重复序列多态性在我国西南地区妇女原因不明月经过少患病组与对照组当中的分布情况,从而探讨 ERa 基因二核苷酸重复序列多态性与原因不明月经过少关系。

1 材料与方法

1.1 临床资料

选取 2003 年 2 月至 2005 年 11 月在重庆医科大学附属第一医院就诊的原因不明月经过少患者 100 例作为观察组,年龄 20~40 岁,平均 31.5 岁。同期的正常月经妇女 100 例作为对照组,年龄 20~40 岁,平均 28.4 岁。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。个体间无血缘关系。检查前 3 月未接受任何性激素治疗。年龄 20~40 岁。

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 聚合酶链反应(Polymerase Chain Reaction,PCR) PCR 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。上游 5' GAC GCA TGA TAT ACT TCA CC 3',下游 5'GCA GAA TCA AAT ATC CAG ATG 3'。60μl 反应体系含 DNA 5μl,10×Buffer 5.0μl,10mmol/LdNTP 1μl,TaqDNA 聚合酶 0.3μl,上下游引物各 1.5μl。PCR 反应采用美国 Perkin Elmer 公司 9600 型 PCR 仪。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 15μl 在含溴化乙锭的 2%琼脂糖凝胶上电泳,利用紫外线透射仪观察实验结果。

1.2.4 PCR 产物纯化 Agrose(紫外灯下切)+resin→70℃溶解→过柱→2ml80%异丙醇吹打→离心→50μl 1×TE 水溶解→12000r/min 20s→纯化产物。

1.2.5 测序 雌激素受体基因测序由 PCR 产物送上海生工生物工程技术服务有限公司作测序分析。

1.3 统计方法

计量资料采用平均值土标准差来表示,统计学分析计量资料用 t 检验,计数资料用 χ^2 检验。比较对照组、病例组等位基因的分布频率用 χ^2 检验,比较病例组和正常对照组各个等位基因频率的差别用 Fisher's 确切概率法。设定 $P<0.05$ 时差异有显著性。

2 结 果

2.1 琼脂糖凝胶电泳结果

用 PCR 扩增产物 8μl 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 160bp 与 190bp 之间可见明显的 PCR 扩增条带,小于 100bp 的条带为引物二聚体(见图 1)。

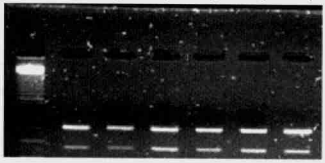


图 1 ERa 基因上游(TA)n 二核苷酸串联重复序列的 PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳,PCR 扩增产物位于分子量标准 160~190 之间。1 道为 marker,2~7 道为样本条带

2.2 (TA)n 重复序列多态性分析

两组病人 TA 重复序列等位基因的分布频率(见表 1,图 2)。通过 χ^2 检验发现两组病人 TA 重复序列等位基因的分布频率,差异有显著性($\chi^2=13.412$, $P=0.037$);再以 Fisher's 确切概率法分别比较两组病人各等位基因的频率是否有差别,发现病例组病人 TA13 等位基因频率高于对照组,差异有显著性($P=0.006$);TA15 等位基因频率低于对照组,差异有显著性($P=0.033$)。病例组 TA13 等位基因存在 1 例纯合子,为了避免重复计数造成等位基因对疾病作用的放大,我们对纯合子仅计数 1 次,所得结果差异仍有显著性($P=0.014$)。

3 讨 论

原因不明月经过少是近年来临床上出现的一类症状。以前人们多对月经过多重视,但我们在临床工作中发现一类病人其月经量少(少于 30ml)的病人,其无内外科及先天疾病,且性激素水平正常。由于雌激素是月经调节的主要激素,其通过与雌激素受体(ER)作用,而且前期研究发现此类病人 ER

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 ERa 基因(TA)n 重复序列等位基因与原因不明月经过少的关系

	病例组	对照组	*P* 值
TA11	2	0	NS
TA12	11	5	NS
TA13	33(30)	12	0.006(0.014)
TA14	23	35(30)	NS
TA15	13	30	0.033
TA16	9	13	NS
TA17	9	2	NS

括号内为纯合子仅计数 1 次的结果。NS:差异无显著性。

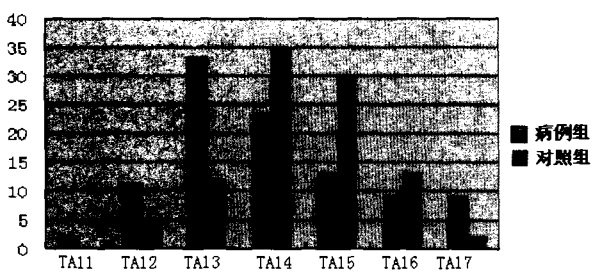


图 2 病例组和对照组 ERa 基因(TA)n 重复序列各种等位基因的分布图

表达减少，因此 ERa 基因变化可能与原因不明月经过少有关。

ERa 结构：ERa 是糖蛋白，属于Ⅰ型核变体超家族成员（甾体激素、甲状腺素、视黄醛受体等）。ER 有数个结构不同的功能域。受体分子从 N 末端到 C 末端的结构是：N 末端为 A/B 区域，具有转录活化功能；中间的区域也称 C 区域，为 DNA 结合区（DBD），这一区域可与特异的 DNA 结合；与 DNA 结合区相邻的是 D 区或铰链区，它的特性尚不清楚；C 末端为配体结合区（LBD 或 E/F 区），具有与配体结合、转录激活、热休克蛋白结合、核定位信号的功能。ERa 基因由 8 个外显子和 7 个内含子组成[3]。

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[4]认为从统计学角度看，其产生采用的是逐步突变模式（Stepwise mutation model，SSM），即每 1 次突变均增加 1 个或数个重复单位，从而导致 1 个新的等位基因的出现。核苷酸重复序列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。

1999 年[5]希腊学者研究了雌激素受体基因 TA 重复序列的变异性与子宫内膜异位症之间的关系，发现其变异性与子宫内膜异位症的病理发生机制有关，15 次 TA 重复在实验组显著且与对照组相比有统计学差异，20 次 TA 重复在对照组显著且与实验组比较有统计学差异。Kim SH[6]实验发现 I/II 子宫内膜异位症病人 TA 重复序列低，说明雌激素受体基因上游微卫星结构 TA 重复序列的不稳定性与该病发病间的相关性。2003 年台湾学者[7]做了雌激素受体基因 TA 重复序列的变异性与子宫肌瘤易患性的研究，雌激素受体基因多态性与子宫肌瘤的病理发生机制有关，且 TA 重复序列的长度多态性与子宫肌瘤的易患性相关，TA 重复的 12 次与 13 次重复状态为子宫肌瘤的高发状态，而 16 次 TA 重复则为相对低的发病状态。Hoetzer GL[8]研究表明长 TA 重复序列与健康绝经后妇女内皮组织型纤维蛋白溶酶原激活剂释放有关。Demissie S[9]等人研究表明长 TA 重复序列和其它位点多态性与妇女低密度脂蛋白浓度变化相关。Guarducci E[10]等人研究发现 TA 重复序列长度与不孕男子精子浓度和总精子数成反比，长 TA 重复序列病人精子浓度和总精子数均偏低。Leibowitz D[11]则实验证实 TA 重复序列可能影响左心室体积，长 TA 重复序列则显示左室体积有增高趋势。此外对其它激素依赖性疾病，如乳腺癌、子宫内膜癌、习惯性流产等疾病也存在 TA 重复序列多态性[12]。

在本研究中我们对中国西南人群的 ERa 基因（TA）n 二核苷酸重复序列多态性进行分析，确定 7 种等位基因，病例组和对照组 TA 重复序列等位基因的分布频率，差异有显著性（χ^2=13.412，*P*=0.037）。再以 Fisher's 确切概率法分别比较两组病人各等位基因的频率是否有差别，发现病例组病人 TA13 等位基因频率高于对照组，差异有显著性（*P*=0.006）。TA15 等位基因频率低于对照组，差异有显著性（*P*=0.033）。病例组 TA13 等位基因存在纯合子，为了避免重复计数造成等位基因对疾病的放大作用，我们对纯合子仅计数 1 次，所得结果差异仍有显著性（*P*=0.014）。从而说明 ERa 基因（TA）n 二核苷酸重复序列多态性与原因不明月经过少发生有关，TA13 等位基因是其发病危险因素，TA15 是其保护因素。

ERa 基因 TA 重复序列可能是通过不同 mRNA

维普资讯 http://www.cqvip.com

片段影响或改变内含子转录因子,也可能是其与其它位点多态性形成连锁不平衡[13],从而改变 ERa 基因表达而使 ER 量及功能发生改变。而 ERa 是雌激素发挥作用的中介,雌激素必须通过与 ERa 结合才能发挥作用,故不同的 ERa 基因型有可能决定不同个体间 ER 表达水平与功能差异,进而影响到体内雌激素的生物学效应[14-16]。当然重复序列附近调控部分变异、ERa 基因与其它基因是否存在关联等问题,还有待进行多方面、大样本、多地域、多民族等广泛深入的协同研究。

参 考 文 献

[1] Letonja M, Steblovnik K, Peterlin B, et al. Oestrogen receptor dinucleotide (TA) polymorphism affects total and LDL cholesterol but does not predict premature myocardial infarction in Caucasian men [J]. Acta Cardiol, 2005; 60(3): 307-309.

[2] Sano M, Inoue S, Hosoi T, et al. Association of estrogen receptor dinucleotide repeat polymorphism with osteoporosis [J]. Biochemical and biophysical research communications, 1995; 217(1): 378-383.

[3] Hall JM, Couse JF, Korach KS. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling [J]. Biological Chemistry, 2001; 276(40): 36869-36872.

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

[5] Georgiou I, Syrrou M, Bouba I, et al. Association of estrogen receptor gene Polymorhisms with endometriosis [J]. Fertility and Sterility, 1999; 72(1): 164-166.

[6] 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.

[7] Hsieh YY, Chang CC, Tsai FJ, et al. Estrogen receptor thymine-adenine dinucleotide repeat polymorphismis associated with susceptibility to leiomyoma[J]. Fertil Steril, 2003; 79(1): 96-99.

[8] Hoetzer G, Irmiger HM, Stauffer BL, et al. Estrogen receptor-alpha thymidine and adenine repeat polymorphism and endothelial fibrinolytic regulation in postmenopausal women [J]. Am J Obstet Gynecol, 2005; 193(2): 366-370.

[9] Demissie S, Cupples LA, Shearman AM, et al. Estrogen receptor-alpha variants are associated with lipoprotein size distribution and particle levels in women: the Framingham Heart Study [J]. Atherosclerosis, 2006; 185(1): 210-218.

[10] Guarducci E, Nuti F, Becherini L, et al. Estrogen receptor alpha promoter polymorphism: stronger estrogen action is coupled with lower sperm count[J]. Hum Reprod, 2006; 21(4): 994-1001.

[11] Leibowitz D, Dresner-Pollak R, Dvir S, et al. Association of an estrogen receptor-alpha gene polymorphism with left ventricular mass[J]. Blood Press, 2006; 15(1): 45-50.

[12] Gennari L, Melotti D, De Paola V. Estrogen receptor gene polymorphisms and the genetics of steoporosis: a HuGE review[J]. Am J Epidemiol, 2005; 161(4): 307-320.

[13] Weiderpass E, Persson I, Hahan M, et al. Estrogen receptor a gene polymorphisms and endometrial cancer risk [J]. Carcinogeeis, 2000; 21(4): 623-627.

[14] Deng HW, Li J, Li JL, et al. Charges of bonemass in post-menopausal Caucasian woman with and without hormone replacment therapy is associated with vitamin D receptor and estrogen receptor genotypes [J]. Hum Genet, 1998; 103(5): 576-585.

[15] Pollake A, Rokach A, Blumennfeldt A, et al. Association of oestrogen receptor alpha gene polymorphism with the angiographic extent of coronaryartery disease[J]. EurHeart, 2004; 25(3): 240-245.

[16] Han W, Kang D, Lee KM, et al. Full sequencing analysis of estrogen receptor alpha gene polymorphism and its association with breast cancer risk[J]. Anticancer Res, 2003; 23(6): 4703-4707.

(上接第 696 页)

[9] Sun B, Wang B, Ahao X. Expression of FADD in primary hepatocellular carcinoma and its relationship with hepatic apoptosis [J]. Zhonghua Gan Bing Za Zhi, 2000; 8(1): 37-39.

[10] 顾 炜,彭志海,裘国强,等.肝癌组织中凋亡信号蛋白的表达及其临床意义[J].中国肿瘤,2003;12(1):48-50.

[11] Zhao R, Hirano M, LKurita S. Expression of proliferating cell nuclear antigen in premalignant lesions of the larynx[J]. Am Otolaryngeal, 1996; 17: 36-44.

[12] 杨 培,罗亿治.增殖细胞核抗原研究进展[J].重庆医科大学学报,1998;3:327-328.

[13] Okuno Y, Nishimura Y, Kashu I, et al. Prognostic values of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 for radiotherapy of oesophageal squamous cell carcinomas [J]. Br J Cancer, 1999; 80(3-4): 387-395.