

## CYP1B1 432C/G 基因多态性与子宫内膜异位症易感性的相关研究

陈茜<sup>1)</sup>, 王玉凤<sup>1)</sup>, 宗利丽<sup>2)</sup>

(1) 广州市红十字会医院、暨南大学医学院第四附属医院妇产科, 广东 广州 510220; 2) 南方医科大学中医药学院中西医结合医院妇产科, 广东 广州 510315)

**[摘要]** **目的** 探讨中国南方汉族妇女 CYP1B1 基因第 3 外显子 432C/G (rs1056836) 位点单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 与子宫内膜异位症 (endometriosis, Ems) 遗传易感性的相关性. **方法** 收集经手术证实的 432 例 Ems 患者和 499 例对照人群外周血, 采用荧光定量 PCR 为基础的高分辨率熔解曲线分析 (high resolution melting, HRM) 技术检测 CYP1B1 432C/G 基因 SNP. **结果** 病例组和对照组妇女 CYP1B1 432C/G 位点 CC、CG、GG 基因型频率分别为 80.6%、18.8%、0.7% 以及 77.6%、21.0%、1.4%, 2 组的基因频率分布差异无统计学意义 ( $P>0.376$ ); C 和 G 等位基因分布为 89.8%、10.1% 以及 88.1%、11.9%, 2 组差异无统计学意义 ( $P>0.376$ ). **结论** 中国南方汉族妇女 CYP1B1 432C/G 位点 SNP 与 Ems 遗传易感性无明显相关性.

**[关键词]** 子宫内膜异位症; 细胞色素 P450 1B1; 单核苷酸多态性; 高分辨率熔解曲线分析

**[中图分类号]** R711.75 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706 (2012) 07-0021-03

## Association of the CYP1B1 432C/G Gene Polymorphism with Susceptibility to Endometriosis

CHEN Qian<sup>1)</sup>, WANG Yu-feng<sup>1)</sup>, ZONG Li-li<sup>2)</sup>

(1) Dept. of Gynecology and Obstetrics, Guangzhou Red Cross Hospital, The Fourth Affiliated Hospital of Medical College of Jinan University, Guangzhou Guangdong 510220; 2) Dept. of Gynecology and Obstetrics, Hospital of Integrated Traditional Chinese Medicine and Western Medicine, School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou Guangdong 510315, China.)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the association of cytochrome P450 1B1 in exon 3 codon 432 (C→G) (rs1056836) single nucleotide polymorphism (SNP) with the genetic susceptibility to endometriosis (Ems) in south Han Chinese women. **Methods** A case-control study was performed in 432 Ems patients and 499 control women to evaluate the SNP of CYP1B1 432C/G by using a fluorescent quantitative PCR-based high resolution melting (HRM) method. **Results** The frequencies of genotypes CC, CG, GG and two alleles CG in controls (77.6%, 21.0%, 1.4%, 88.1% and 11.9%) were not significantly different from those in patients with endometriosis (80.6%, 18.8%, 0.7%, 89.8% and 10.1%). **Conclusion** There is no significant association between the SNP of CYP1B1 432C/G and genetic susceptibility to Ems in south Han Chinese women.

**[Key words]** Endometriosis; Cytochrome P450 1B1; Single nucleotide polymorphism; High resolution melting curve

子宫内膜异位症 (endometriosis, Ems) 指以子宫内膜样组织异位种植在子宫腔外, 引起患者痛经、不孕和月经异常等症状, 是妇科常见病, 发病

率达 10%<sup>[1]</sup>. Ems 在临床上表现为一种雌激素依赖性疾病, 国际上亦有较多资料证明雌激素及其代谢与 Ems 的发生有关. CYP1B1 是一种重要的细胞色

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目 (30801012)

**[作者简介]** 陈茜 (1963~), 女, 广东三水市人, 医学硕士, 副主任医师, 主要从事妇产科临床工作.

**[通讯作者]** 宗利丽. E-mail: zonglili2002@yahoo.com.cn

素氧化酶,广泛存在于肺、乳腺、子宫等组织中,是  $17\beta$ -雌二醇 (E2) 代谢的关键酶. 在雌激素相关的组织 (如乳腺、子宫、卵巢) 中高表达,提示 CYP1B1 在雌激素局部代谢及维持雌激素平衡起重要作用. 目前已发现 CYP1B1 具有多态位点,这就决定个体在其一生对雌激素的暴露水平的差异. 本研究采用高分辨率熔解曲线分析 (High Resolution Melting, HRM) 技术检测 931 名中国南方汉族妇女 (432 例 Ems 患者和 499 例对照人群) CYP1B1 432C/G 基因 SNP,旨在探讨 CYP1B1 基因第 3 外显子 432C/G 位点单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 与 Ems 遗传易感性的相关性.

## 1 对象与方法

### 1.1 对象

收集 2008 年 10 月至 2010 年 4 月在南方医科大学南方医院、南方医科大学珠江医院、广州市红十字会医院及佛山市第一人民医院妇产科行腹、盆腔手术并经病理检查确诊为 Ems 或子宫腺肌症者 432 例为 Ems 组;选择同期行腹、盆腔手术而术中未发现 Ems 病灶者 499 例为对照组. 两组受检者均为中国南方汉族妇女且年龄、孕产史间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ). 所有受检者均无 Ems 家族史,无其它遗传病家族史及肿瘤史. 研究对象间不存在亲缘关系,且均知情同意.

### 1.2 标本来源

两组受检者均于手术后第 3 日留取外周血 2 mL,柠檬酸钠抗凝置于  $-70^{\circ}\text{C}$  低温冰箱中保存. 从全血中提取基因组 DNA (E.Z.N.A 96TM Blood DNA Kit, Omega),将 DNA 样品的浓度调至约 5 ng/ $\mu\text{L}$ , $-20^{\circ}\text{C}$  保存待测.

### 1.3 引物的设计与合成

CR 引物采用 Primer Premier 5 和 Oligo 6 软件综合分析设计. CYP1B1 432C/G (rs1056836) 上游引物序列: 5'-CTTGGGCTACCACATTCC-3',下游引物序列: 5'-TGTCAGGTCCTTGTGATG-3',探针: 5'-GCCACTTCAGTGGGTCATGATTCACAG-ACC-3';探针的 3' 末端阻断,避免反应过程中延伸,引物由 invitrogen 公司合成.

### 1.4 以定量 PCR 为基础的 HRM 分型

反应体系中,上下游引物浓度比为 1:10,即 10  $\mu\text{L}$  反应体系中,上游引物终浓度为 0.3 pmol,下游引物终浓度为 3 pmol,探针浓度为 3 pmol. 扩增长度 148 bp,探针特异与 C 互补. PCR 反应总

体积 10  $\mu\text{L}$ : 引物与探针各 0.3  $\mu\text{L}$ , TOYOBO 公司的 Realtime PCR Master Mix (QPK-101) 5  $\mu\text{L}$ , LC Green Plus 1  $\mu\text{L}$ , 模版 3.1  $\mu\text{L}$ . 循环参数为:  $95^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min  $\rightarrow$   $95^{\circ}\text{C}$  变性 15 s  $\rightarrow$   $60^{\circ}\text{C}$  复性 20 s  $\rightarrow$   $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 s, 55 个循环;之后进入熔解曲线阶段,从  $55^{\circ}\text{C}$  一直做到  $95^{\circ}\text{C}$ ,根据荧光定量 PCR 仪 Roche Light Cyclery<sup>®</sup> 480 软件分析熔解曲线,得出基因型.

### 1.5 SNP 位点分析

CYP1B1 基因 432C/G (rs1056836) 位点纯合子用 CC、GG 表示,杂合子用 CG 表示.

$$\text{等位基因频率} = \frac{2 \times \text{纯合子数} + \text{杂合子数}}{2 \times \text{受检人群}}$$

### 1.6 统计学处理

用直接计数法计算各组基因型频率分布. 遗传平衡吻合度  $\chi^2$  检验群体基因型频率分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡定律. 两组之间基因型频率、等位基因频率比较用  $\chi^2$  检验,用比值比 (odds ratio, OR) 及 95% 可信区间 (confidence interval, CI) 表示相对危险度. 数据均用统计软件 SPSS13.0 处理.

## 2 结果

### 2.1 根据 HRM 检测 SNP 分型

根据熔解曲线荧光和峰值的差异来有效区分不同标本 CYP1B1 432C/G 位点 SNP,结果由荧光定量 PCR 仪 Roche Light Cyclery<sup>®</sup> 480 软件分析输出,该位点的基因型明显的分为 CC、CG、GG 3 型,见图 1.

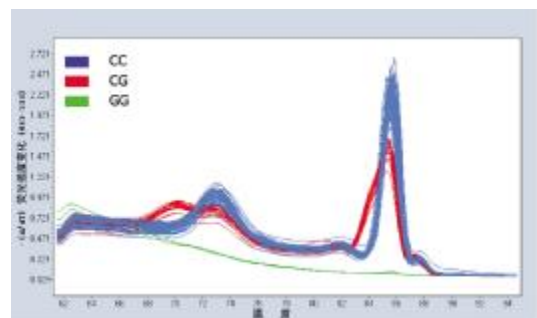


图 1 CYP1B1 432C/G 位点 HRM 分型结果

Fig. 1 The HRM phenotyping results of CYP1B1 432C/G

### 2.2 Hardy-Weinberg 平衡检验

经吻合度检验, CYP1B1 432C/G 在 Ems 组及对照组中的基因频率分布均符合 Hardy-Weinberg

遗传平衡定律,说明纳入的样本具有人群代表性。Ems 组和对照组中 CYP1B1 432C/G 以 CC 基因型最为常见,其次为 CG 型,GG 型比较少见,各基因型频率比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。2 组间

A 与 G 等位基因频率差异亦无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),其 OR 值为 1.209 (95%CI:0.902 ~ 1.620),见表 1。

表 1 Ems 组和对照组 CYP1B1 432C/G 位点多态性比较 [n(%)]

Tab. 1 Comparison of CYP1B1 432C/G polymorphism between Ems group and control group [n(%)]

基因多态性	基因型频率		等位基因频率	
	内异症组	对照组	内异症组	对照组
CYP1B1 432C/G				
CC	261(60.4)	324(65.7)	A:680(78.7)	A:804(81.5)
CG	158(36.6)	156(31.6)	G:184(21.3)	G:182(18.5)
GG	13(3.0)	13(2.6)		

### 3 讨论

细胞色素 P450 是活化环境毒素的主要酶类,同时参与体内雌激素的代谢。CYP1B1 是细胞色素 P450 超基因家族成员,参与环境中多种前致癌物及抗癌物的激活、代谢,并介导 17-雌二醇的 C4 羟化,羟化的雌激素具有潜在致癌性。酶的代谢能力的差异是由基因多态性决定的,已有研究表明 CYP1B1 基因多态性与多种肿瘤的发生具有相关性,如子宫内膜癌、卵巢癌等<sup>[2,3]</sup>。CYP1B1 基因多态性可能通过提高 CYP1B1 酶的活性导致局部雌激素代谢紊乱,从而促进 Ems 的发生、发展。

CYP1B1 位于染色体 2p22-21,全长 12 kb,有 3 个外显子和 2 个内含子。目前发现 CYP1B1 具有 6 个多态性位点<sup>[4]</sup>,但只有其中 4 个导致氨基酸的改变,其中包括第 3 外显子上 432 密码子多态性位点 C→G。查阅国内外相关文献,提示研究位点主要集中在第 2 外显子 119G→T 和第 3 外显子 432C/G,由于不同人种遗传背景差异导致研究结论不尽相同,关于中国人群尤其是南方汉族人群 432C/G 位点的研究,研究数据报道尚少,因此本研究重点探讨中国南方汉族人群 432C/G 位点的多态性。

本研究结果显示中国南方汉族妇女 CYP1B1 432C/G 位点等位基因及其基因型的分布在 Ems 组和对照组间均无显著差异,由此提示 CYP1B1 432C/G 位点多态性可能与中国南方汉族妇女 Ems 遗传易感性无相关性。这一发现与李益格等<sup>[5]</sup>2009 年报道的在湖南人群小样本量研究中 CYP1B1 432C/G 各基因型的分布结论相同。这更进一步证明 CYP1B1 432C/G 位点的多态性与 Ems 相关性不

大。但是有研究提出,CYP1B1 119G/T 杂合型合并 CYP1B1 432C/G 野生型个体能明显增加 Ems 的发病风险<sup>[5]</sup>,这有待今后进一步研究加以明确。

分析本研究结果与上述的报道,可得出一致的结论,即 CYP1B1 432C/G 位点多态性可能不是 Ems 遗传易感因素。然而,人体代谢过程非常复杂,有赖于多种因素的共同作用,而且子宫内膜异位症作为一种多基因病,其发病受许多对致病微效基因和环境因素的共同影响,1 个多态性的微弱作用在分析中可能不足以被发现。但本研究作为目前国内外最大样本量的研究,对探索 Ems 的遗传机制是有价值的。

#### [参考文献]

- [1] GIUDICE L C. Clinical practice Endometriosis[J]. N Engl J Med,2010,362(25):2 389 - 2 398.
- [2] 朱壮彦,糜若然,刘静,等. CYP1B1 基因多态性与卵巢癌易感性的研究[J]. 现代妇产科进展,2006,15:184 - 187.
- [3] HOLT S K, ROSSING M A, MALONE K E, et al. Ovarian cancer risk and polymorphisms involved in estrogen catabolism [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007,16:481 - 489.
- [4] RYLANDER T, WEDREN S, GRANATH F. Cytochrome P4501B1 gene polymorphisms and postmenopausal breast cancer risk [J]. Carcinogenesis, 2003, 24 (9): 1 533 - 1 539.
- [5] 李益格,王新. CYP1B1 基因多态性与子宫内膜异位症易感性的相关研究[J]. 中华医学遗传学杂志,2009,26(1):66 - 69.

(2012-02-21 收稿)