

谷胱甘肽S-转移酶M1基因缺失与子宫内膜异位症易感性的关系

近年来随着对环境毒素在子宫内膜异位症(内异症)发病机制中的作用的深入研究,解毒酶在内异症发病中充当的角色也越来越受到重视[1]。国外学者研究发现内异症遗传易感性与环境毒素II相解毒酶谷胱甘肽S-转移酶M1(glutathione S-transferase M1, GSTM1)基因多态性相关[2][3]。GSTM1基因多态性具有明显的地区及种族差异。本研究应用聚合酶链反应(PCR)技术对广东汉族内异症患者和非内异症妇女GSTM1基因型进行检测,以探讨GSTM1基因多态性与广东汉族妇女内异症易感性的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

内异症患者76例,为2000年2月~2001年12月在第一军医大学珠江医院、南方医院,中山大学附属第二医院经剖腹或腹腔镜手术后病理证实为内异症的住院患者。年龄21~45岁,按美国生育协会修正标准(rAFS)分期: I期19例, II期17例, III期22例, IV期18例。对照组为同期因为异位妊娠、要求绝育及输卵管吻合术等在我院行盆腔内手术而术中未发现子宫内异位病灶的患者80例,其中异位妊娠62例、要求绝育16例、输卵管吻合术后2例,年龄23~41岁,无遗传病家族史。两组均为无血缘关系的广东籍汉族妇女,年龄、职业等分布均衡,并且均在原籍稳定居住3代以上。

1.2 研究方法

1.2.1 标本收集 从上述两组人群中每人抽取外周静脉全血3 ml,柠檬酸钠抗凝, -80 °C保存待测。

1.2.2 基因组DNA的制备 用改良的盐析法提取基因组DNA。采取用核酸蛋白质测定仪(德国Eppendorf公司产品)测定DNA纯度($D_{260}/D_{280} > 1.8$)和浓度。

1.2.3 PCR反应 根据文献[3]设计GSTM1基因引物,其序列为上游5' -CTGCCCTACTTGATTGATGG G-3', 下游5' -CTGGATTGTAGCAGATCATGC-3', 扩增片段长度219 bp。进行PCR扩增时,同时以白蛋白基因为内参照,所用引物序列: 上游5' -GCCCTCTG CTAACAAGTCCTAC-3', 下游为5' -GCCCTAAAA GAAAATCGCCATC-3'。扩增白蛋白基因的PCR产物为350 bp。GSTM1和白蛋白基因的2对引物同在1个反应管作PCR。PCR的反应条件: 反应总体积50 μ l, 含有200 μ mol/L dNTP, GSTM1基因及白蛋白基因上、下游引物各0.4 μ mol/L, 基因组DNA 0.4 μ g, 1 U Taq DNA聚合酶(Promega公司产品)。在PCR仪(西安天隆科技有限公司DTC-3C型)上扩增。扩增参数: 94 °C预变性5 min, 然后94 °C 30 s, 60 °C复性50 s, 72 °C延伸45 s, 35个循环后72 °C延伸7 min。

1.2.4 结果判断 取10 μ l PCR产物经1.8%琼脂糖凝胶(含0.5 μ g/ml溴化乙锭)电泳60 min, 电压50 V, 在紫外反射透射仪上观察结果。若扩增的PCR产物无219 bp条带, 仅显示350 bp条带, 则为GSTM1基因缺失纯合子(GSTM1 0/0), 若同时显示219 bp及350 bp条带, 则为GSTM1基因纯合子(GSTM1 +/+)或缺失杂合子(GSTM1 +/0)。

1.3 统计学方法

用直接计数法计算各组基因型频率分布。两组之间基因型频率比较用 χ^2 检验。用比值比(OR)及95%可信区间(95%CI)表示相对危险度。数据均用SPSS10.0软件进行统计分析。

2 结果

GSTM1基因及内参照白蛋白基因PCR产物电泳结果见图1。GSTM1各等位基因型在病例和对照组中的频率分布见表1。两组基因型频率比较具有显著性差异($\chi^2=6.03, P=0.014$)，内异症病例组GSTM1基因缺失纯合子基因型频率明显高于对照组。若以GSTM1+(+/+, +/0)基因型个体的OR值为1，GSTM1基因纯合缺失个体(0/0)的OR值为2.24，95%CI为1.17~4.27。

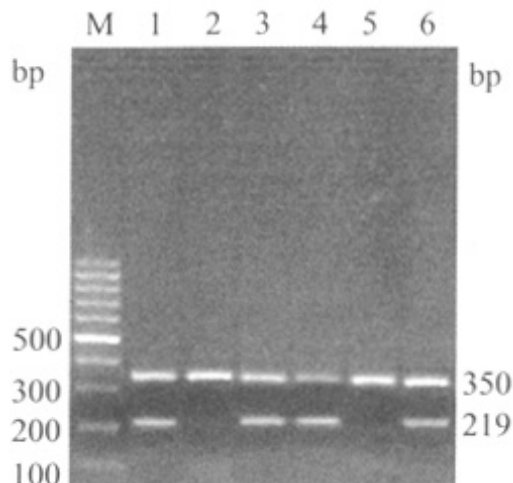


图1 GSTM1基因及内参照白蛋白基因PCR产物电泳结果

Fig.1 Electrophoresis result of the PCR product of GSTM1 and albumin gene (as internal control)

M: 100 bp DNA ladder marker; Lanes 1, 3, 4, 6: Genotype GSTM1 +/+ or GSTM1 +/0; Lanes 2, 5: Genotype GSTM1 0/0

表1 GSTM1基因型在内异症组和对照组中的分布

Tab.1 Distribution of GSTM1 genotypes in endometriosis patient group and the control group

Group	n	Genotypes	
		GSTM1+ (+/+ or +/0)	GSTM1- (0/0)
Endometriosis	76	26(34.2%)*	50(65.8%)*
Control	80	43(53.7%)	37(46.3%)

* $P<0.05$ vs control

3 讨论

GSTM1基因属于GST超基因家族，是重要的II相解毒代谢酶。GSTM1可代谢二噁英、苯并芘等环境毒素，

使其失活。GSTM1基因的缺失率在不同的人群和种族中不同，正常人群GSTM1空白基因型频率波动在29%~66% [4][5]。GSTM1基因缺陷型不能产生有活性的酶蛋白，使机体对环境毒素的解毒能力下降，大量研究发现GSTM1基因多态性与环境毒素暴露相关的肿瘤易感性有关。

目前认为内异症可能是遗传易患性和环境因素相互作用所致[6]。近年发现内异症与环境毒素特别是二噁英的暴露存在明显相关性[6][7]。GSTM1作为二噁英等环境毒素重要的II相解毒代谢酶，其基因多态性与内异症易感性的关系受到重视。Baranova等[2][3]研究发现高加索人群中内异症患者的GSTM1空白基因型频率显著高于对照组，GSTM1基因缺陷型个体能明显增加内异症的发病风险。但GSTM1基因多态性分布具有明显的种族及地区差异。最近Hadfield等[9]报道美国白种人GSTM1基因多态与内异症遗传易感性无明显关系。本研究的结果显示，GSTM1空白基因型频率在广东汉族妇女内异症病人和对照组之间有显著差异，内异症患者的GSTM1空白基因型频率显著高于对照组。GSTM1空白基因型的个体患内异症的风险是GSTM1非空白基因型个体的2.24倍。由此提示GSTM1基因缺陷可能是广东汉族妇女内异症的遗传易感因素之一。内异症是一种多因素致病的疾病，由于本研究例数尚少，同时研究对象缺乏环境毒素暴露的详细资料，因此有待扩大样本及选择健康对照进行研究，同时详细研究基因缺陷和环境毒素暴露的交互作用对内异症发病的影响，从而明确GSTM1基因多态性与内异症的关系。

参考文献:

[1] 彭冬先, 何援利, 丘立文, 等. 广东汉族妇女CYP1A1基因Msp I多态性与子宫内膜异位症的关系[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(9): 814-6.

Peng DX, He YL, Qiu LW, et al. Susceptibility to endometriosis in women of Han Nationality in Guangdong Province associated with Msp I polymorphisms of cytochrome P450 1A1 gene[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(9): 814-6.

[2] Baranova H, Bothorishvilli R, Canis M, et al. Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism and susceptibility to endometriosis in a French population[J]. Mol Hum Reprod, 1997, 3(9): 775-80.

[3] Baranova H, Canis M, Ivaschenko T, et al. Possible involvement of arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1 genes in the development of endometriosis[J]. Mol Hum Reprod, 1999, 5(7): 636-41.

[4] Norppa H. Cytogenetic markers of susceptibility: influence of poly-morphic carcinogen-metabolizing enzymes[J]. Environ Health Perspect, 1997, 105(Suppl 4): 829-35.

[5] Chen CL, Lin Q, Relling MV. Simultaneous characterization of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms by polymerase chain reaction in American whites and blacks[J]. Pharmacogenetics, 1996(2): 187-97.

[6] Kennedy S. Is there a genetic basic to endometriosis[J]? Semin Reprod Endocrinol, 1997, 15(3): 309-11.

[7] Birnbaum LS, Cummings AM. Dioxins and endometriosis: a plausible hypothesis[J]. Environ Health Perspect, 2002, 110(1): 15-21.

Rier SE. The potential role of exposure to environmental toxicants in the pathophysiology of endometriosis[J]. Ann N Y Acad Sci, 2002, 955: 201-12.

[9] Hadfield RM, Manek S, Weeks DE, et al. Linkage and association studies of the relationship between endometriosis and genes encoding the detoxification enzymes GSTM1, GSTT1 and CYP1A1[J]. Mol Hum Reprod, 2001, 7(11): 1073-8.

参考文献:

[1] 彭冬先, 何援利, 丘立文, 等. 广东汉族妇女CYP1A1基因Msp I多态性与子宫内膜异位症的关系[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(9): 814-6.

Peng DX, He YL, Qiu LW, et al. Susceptibility to endometriosis in women of Han Nationality in Guangdong Province associated with Msp I polymorphisms of cytochrome P450 1A1 gene[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(9): 814-6.

[2] Baranova H, Bothorishvilli R, Canis M, et al. Glutathione S-transferase M1 gene polymorphism and susceptibility to endometriosis in a French population[J]. Mol Hum Reprod, 1997, 3(9): 775-80.

[3] Baranova H, Canis M, Ivaschenko T, et al. Possible involvement of arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1 genes in the development of endometriosis[J]. Mol Hum Reprod, 1999, 5(7): 636-41.

[4] Norppa H. Cytogenetic markers of susceptibility: influence of polymorphic carcinogen-metabolizing enzymes[J]. Environ Health Perspect, 1997, 105(Suppl 4): 829-35.

[5] Chen CL, Lin Q, Relling MV. Simultaneous characterization of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms by polymerase chain reaction in American whites and blacks[J]. Pharmacogenetics, 1996(2): 187-97.

[6] Kennedy S. Is there a genetic basis to endometriosis[J]? Semin Reprod Endocrinol, 1997, 15(3): 309-11.

[7] Birnbaum LS, Cummings AM. Dioxins and endometriosis: a plausible hypothesis[J]. Environ Health Perspect, 2002, 110(1): 15-21.

Rier SE. The potential role of exposure to environmental toxicants in the pathophysiology of endometriosis[J]. Ann N Y Acad Sci, 2002, 955: 201-12.

[9] Hadfield RM, Manek S, Weeks DE, et al. Linkage and association studies of the relationship between endometriosis and genes encoding the detoxification enzymes GSTM1, GSTT1 and CYP1A1[J]. Mol Hum Reprod, 2001, 7(11): 1073-8.