

# CYP19, COMT 等位基因突变与子宫内膜异位症和子宫腺肌病的相关性研究

李攀 顾振鹏 刘顺振 代培培 姚丽娟

**【摘要】目的** 探讨山东省滨州地区汉族妇女 CYP19 基因 240A/G, COMT 基因 1947G/A 位点单核苷酸多态性(SNP)与子宫内膜异位症(EMs)和子宫腺肌病(AM)发病的关系。**方法** 收集 2011 年 9 月至 2012 年 3 月于本院妇产科行盆、腹腔手术,并经术后组织病理学检查证实为 EMs 和 AM 者 80 例为研究对象,并将其分别纳入 EMs 组( $n=30$ )和 AM 组( $n=50$ ),选取同期于本院行盆、腹腔手术并经肉眼及术后组织病理学检查排除 EMs 和 AM 者 38 例纳入对照组。采集其晨空腹外周静脉血(3~4)mL,采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)技术检测 2 者基因多态性与 EMs 和 AM 发病的关系(本研究遵循的程序符合本院人体试验委员会制定的伦理学标准,得到该委员会批准,分组征得受试对象的知情同意)。**结果** CYP19 240A/G 位点各基因型及等位基因分布频率在 EMs 组,AM 组和对照组比较,差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),其中等位基因 G 突变可使 EMs 发病风险增加 2.463 倍,AM 发病风险增加 2.705 倍,携带 AG 和 GG 基因型妇女的 EMs 发病风险增加 4.444 倍,AM 发病风险增加 3.939 倍。COMT 1947G/A 位点各基因型及等位基因分布频率在 EMs 组,AM 组和对照组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),携带 A 等位基因突变的基因型 GA+AA 分别与野生型 GG 比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ ),携带 A 等位基因的基因型(GA+AA)不能增加 EMs 和 AM 发病风险。**结论** 滨州地区汉族妇女 CYP19 基因 240A/G 等位基因突变,可增加 EMs 和 AM 发病风险,而 COMT 基因 1947G/A 等位基因突变与 EMs 和 AM 发病风险无相关性。

**【关键词】** 子宫内膜异位症; 子宫腺肌病; CYP19; COMT; 等位基因突变

**Correlative Study on Mutant allele of CYP19 240A/G, COMT 1947G/A, Endometriosis and Adenomyosis** LI Pan, GU Zhen-peng, LIU Shun-zhen, DAI Pei-pei, YAO Li-juan. Department of Gynecology and Obstetrics, Affiliated Hospital of Binzhou Medical College, Binzhou 256603, Shandong Province, China. (Corresponding author: GU Zhen-peng, Email: zhenpeng6729@163.com)

**【Abstract】Objective** To investigate the correlation of polymorphism of CYP19 240A/G, COMT 1947G/A, endometriosis (EMs) and adenomyosis (AM). **Methods** From September 2011 to March 2012, thirty cases of EMs and 50 cases of AM were recruited into this study. Meanwhile, thirty-eight cases without EMs and AM were included into control group. The blood were collected from all of them in the morning after the operation. The correlation between the multibus of two genes about EMs and AM was evaluated by PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The study protocol was approved by the Ethical Review Board of Investigation in Human Being of Affiliated Hospital of Binzhou Medical College. Informed consent was obtained from all participates. **Results** There were a significant difference of the alleles and genotype of CYP19 240A/G between EMs group, AM group and control group ( $P<0.05$ ). The mutant allele of G made relative risk suffered from EMs and AM got 2.463 times, 2.705 times, respectively. The relative risks suffered from EMs and AM of AG and GG genotype were 4.444 and 3.939 times of GG genotype, respectively. There were no significant difference of the alleles and genotype of COMT 1947G/A between EMs group, AM group and control group ( $P>0.05$ ). There were no significance between the genotype that caught A(GA+AA) and GG genotype ( $P>0.05$ ). There was no correlation between GA and AA genotype and the risk suffered from EMs and AM. **Conclusions** The mutant allele of CYP19 240A/G increased the risk suffered from EMs and AM. The mutant allele of COMT 1947A/G had no relationship with the risk of EMs and AM.

**【Key words】** endometriosis; adenomyosis; CYP19; COMT; mutant allele

\* Project No. BY2012KJ14, supported by the Science and Research Plan of Binzhon Medical College

## 子宫内膜异位症(endometriosis, EMs)和子宫腺

肌病(adenomyosis, AM)同为子宫内膜异位引起的疾病,是具有活性的宫腔被覆黏膜组织出现在宫腔被覆黏膜以外部位所引起的妇科常见良性病变。EMs 为

子宫内膜腺体及间质出现在子宫体以外部位,可引起痛经、慢性盆腔疼痛等,可致 25%~35% 患者不孕。AM 为子宫内膜腺体及间质侵入子宫肌层,多伴进行性加重性痛经、月经量过多、经期延长、贫血等。两者

DOI:10. 3877/cma. j. issn. 1673-5250. 2013. 01. 014

基金资助项目:2012 年滨州医学院校级科研计划与科研启动基金项目(BY2012KJ14)

作者单位:256603 山东滨州,滨州医学院附属医院妇产科

通信作者顾振鹏(E-mail:zhenpeng6729@163.com)

在病理学上均呈现良性形态学表现,但具有种植、侵蚀及远处转移等类似恶性肿瘤的行为,近年来发病率呈明显上升趋势,严重影响育龄妇女的健康和生活质量。研究显示,绝经或双侧卵巢切除的患者,异位内膜逐渐萎缩、吸收,妊娠或服用性激素抑制剂的患者,可暂时阻止疾病发展。Kitawaki 等<sup>[1]</sup>研究证实,EMs 的发生、发展与雌激素暴露密切相关。由此可见,EMs 和 AM 为雌激素依赖性疾病。由 *CYP19* 基因编码的芳香化酶 p450 是雌激素合成过程中最后一步的限速酶,而由 *COMT* 基因编码的儿茶酚-O-甲基转移酶是雌激素代谢过程的关键酶。因此,*CYP19* 及 *COMT* 等位基因突变与雌激素依赖性的 EMs 和 AM 发病可能有关。本研究采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性 (PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 技术检测山东省滨州地区汉族妇女 *CYP19* 基因 240A/G, *COMT* 基因 1947G/A 位点单核苷酸多态性,旨在探讨 2 种基因单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 在 EMs 和 AM 发病过程中的作用。现将研究结果,报道如下。

## 1 对象与方法

### 1.1 研究对象

收集 2011 年 9 月至 2012 年 3 月于本院妇产科行盆、腹腔手术,并经术后组织病理学检查证实为 EMs 和 AM 者 80 例为研究对象,将其分别纳入 EMs 组 ( $n=30$ ) 和 AM 组 ( $n=50$ ); 选取同期于本院行盆、腹腔手术并经肉眼及术后组织病理学检查排除 EMs 和 AM 者 38 例纳入对照组。所有患者均为滨州地区汉族、育龄妇女,年龄为 21~55 岁,平均为 38 岁,孕次为 0~3 次(本研究遵循的程序符合本院人体试验委员会制定的伦理学标准,得到该委员会批准,分组征得受试对象的知情同意)。3 组患者的年龄、体重、孕次等比较,差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。排除标准:纳入受试者均排除家族性遗传病史、妊娠、肿瘤及近期有激素类药物治疗史者。

### 1.2 方法

**1.2.1 标本来源** 3 组患者均于盆、腹腔术后第 3 天经组织病理学检查结果确诊后,抽取晨空腹外周静脉血 (3~4) mL, EDTA-K2 抗凝,置于 -80℃ 低温冰箱中保存,待用。

**1.2.2 外周血 DNA 提取及定性、定量检测** 采用酚氯仿-乙醇沉淀法提取全血基因组 DNA, 并行电泳鉴定及微量紫外线分光光度仪测定 DNA 浓度、纯度,且 DNA 相对纯度均在 1.7~1.9。

**1.2.3 *CYP19* 基因 240A/G 位点的 SNP 检测** 引物

设计参考 Miyoshi 等<sup>[2]</sup>文献报道,由上海生物工程技术有限公司合成(表 1)。① PCR 反应体系共 50  $\mu$ L, 包括: 2 $\times$ PCR Master Mix 反应体系 25  $\mu$ L (含 0.05 U/ $\mu$ L Tap DNA polymerase, reaction buffer, 4 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mmol/L of each dNTP), 上游引物及下游引物各 1  $\mu$ L, 全血基因组 DNA 0.3  $\mu$ L, 灭菌去离子水 22.7  $\mu$ L。反应程序为: 95℃ 预变性 2 min, 95℃ 变性 30 s, 51℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 30 个循环, 72℃ 充分延伸 10 min, 最后 4℃ 保温。使用 2% 琼脂糖凝胶 90 V 电泳 30 min, 鉴定 PCR 产物, 置于 -20℃ 保存。② 限制性核酸内切酶酶切反应体系共 20  $\mu$ L, 包括: PCR 产物 3  $\mu$ L, 10 $\times$ T buffer 2  $\mu$ L, 0.1% BSA 2  $\mu$ L, 内切酶 RsaI 1  $\mu$ L (10 U/ $\mu$ L), 灭菌去离子水 12  $\mu$ L, 37℃ 水浴恒温 1 h。使用 3% 琼脂糖凝胶 90 V 电泳 50 min, EB 染色 20 min 后, 于凝胶成像系统观察酶切条带, 判断基因型: 野生型 AA 纯合子为 188 bp, 突变 AG 杂合子分别为 188 bp, 164 bp, 24 bp, 突变 GG 纯合子分别为 164 bp, 24 bp。其中 24 bp 片段因过小而于电泳中泳出, 无法观察 (图 1)。

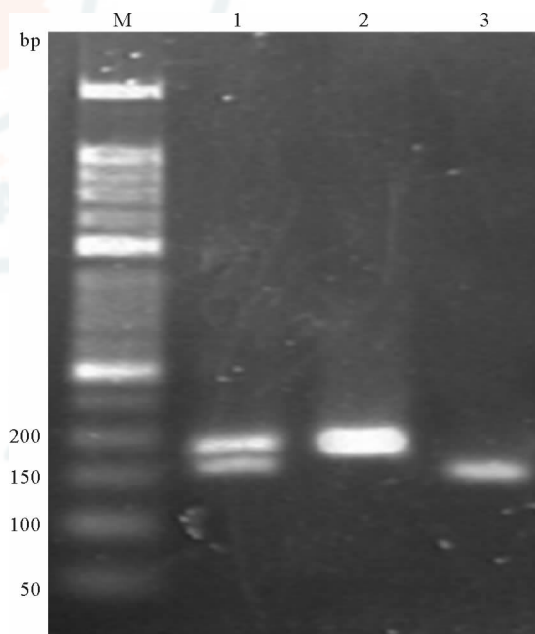


图 1 *CYP19* 240A/G 位点各基因型 (M: marker; 1: AG; 2: AA; 3: GG)

Figure 1 Each genotype of *CYP19* 240A/G (M: marker, 1: AG; 2: AA; 3: GG)

**1.2.4 *COMT* 基因 1947G/A 位点的 SNP 检测** 引物设计参考 Kunuqi 等<sup>[3]</sup>文献报道(表 1)。① PCR 反应体系共 50  $\mu$ L, 包括: 2 $\times$ PCR Master Mix 反应体系 25  $\mu$ L (含 0.05 U/ $\mu$ L Tap DNA polymerase, 0.4 mmol/L of each dNTP, 4 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, reaction buffer), 上游及下游引物各 1  $\mu$ L, 全血基因组

**表 1** CYP19 基因 240A/G 和 COMT 基因 1947G/A 引物序列、退火温度、扩增片段长度

**Table 1** The primer sequence, annealing temperature and amplified fragment length of CYP19 240A/G and COMT 1947G/A, respectively

基因	引物序列(5'→3')	退火温度(°C)	扩增片段长度(bp)
CYP19 240A/G	AGTAACACAGAACAGTTGCA	51	188
	TCCAGACTCGCATGAATTCTCCGTA		
COMT 1947G/A	TCGTGGACGCCGTGATTCAAG	59	217
	AGGTCTGACAACGGGTCAGGC		

DNA 0.3 μL, 灭菌去离子水 22.7 μL。反应程序为: 95℃ 预变性 2 min, 95℃ 变性 30 s, 59℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 30 个循环, 72℃ 充分延伸 10 min, 最后 4℃ 保温。使用 2% 琼脂糖凝胶 100 V 电泳 30 min, 鉴定 PCR 产物, 并置于 -20℃ 保存。② 限制性内切酶酶切反应体系共 20 μL, 包括: PCR 产物 5 μL, 10× G buffer 2 μL, 内切酶 N1a III 0.5 μL (5 U/μL), 灭菌去离子水 12.5 μL, 37℃ 水浴恒温 16 h。使用 3% 琼脂糖凝胶 90 V 电泳 50 min, EB 染色 20 min 后于凝胶成像系统观察酶切条带判断基因型: 野生型 GG 纯合子分别为 136 bp, 81 bp, 突变 GA 杂合子分别为 136 bp, 81 bp, 96 bp, 40 bp, 突变 AA 纯合子分别为 81 bp, 96 bp, 40 bp (图 2)。

判断样本人群 CYP19 和 COMT 基因频率是否符合遗传平衡法则。应用行×列表  $\chi^2$  检验判断 CYP19 和 COMT 基因型及各等位基因在 EMs 组, AM 组和对照组中分布频率的相关性, 并应用比值比 (odds ratio, OR) 及 95% 可信区间 (confidence interval, CI) 判断 CYP19 和 COMT 突变基因型及突变基因与 EMs, AM 发病风险的关联强度。以  $P < 0.05$  示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验

对 CYP19 基因 240A/G 位点和 COMT 基因 1947G/A 位点在 EMs 组, AM 组和对照组中的基因型频率分别进行 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验的结果显示, 3 组患者 CYP19 和 COMT 基因型频率已达遗传平衡 ( $P > 0.05$ )。

### 2.2 CYP19 240A/G 各基因型及等位基因在 EMs 组, AM 组和对照组中的频率分布

EMs 组和 AM 组各基因型频率分布分别与对照组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (表 2)。

**Table 2** Frequency distribution of CYP19, COMT genotypes between EMs group, AM group and control group [n(%)]

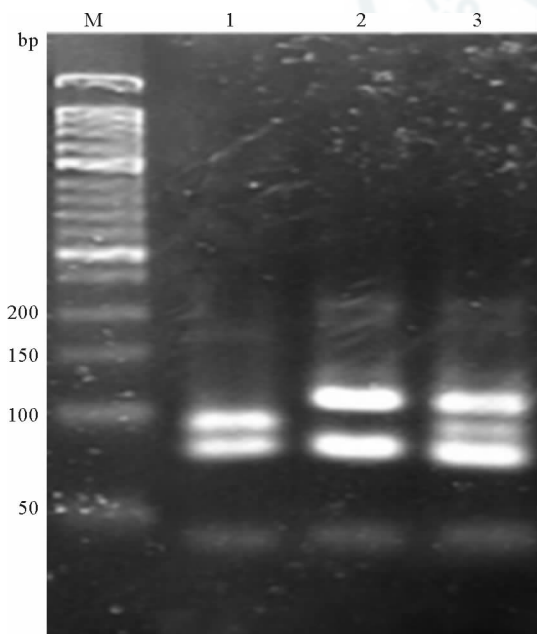
组别	n	基因型频率			$\chi^2$	P
		AA	AG	GG		
<b>CYP19</b>						
EMs 组	30	6(20.00)	17(56.67)	7(23.33)	7.569 <sup>a</sup>	0.023 <sup>a</sup>
AM 组	50	11(22.00)	24(48.00)	15(30.00)	9.422 <sup>a</sup>	0.009 <sup>a</sup>
对照组	38	20(52.63)	13(34.21)	5(13.16)		
<b>COMT</b>						
EMs 组	30	3(10.00)	11(36.67)	16(53.33)	0.861 <sup>a</sup>	0.650 <sup>a</sup>
AM 组	50	3(6.00)	17(34.00)	30(60.00)	1.007 <sup>a</sup>	0.605 <sup>a</sup>
对照组	38	4(10.53)	10(26.32)	24(63.16)		

注: <sup>a</sup> vs. 对照组

EMs 组和 AM 组各等位基因频率分布分别与对照组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (表 2)。EMs 组和 AM 组携带 G 等位基因突变的基因型 AG+GG 分别与野生型 AA 比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (表 4、表 5), 携带 AG 和 GG 基因型妇女的 EMs 发病风险增加 4.444 倍 (95% CI: 1.482~13.326), AM 发病风险增加 3.939 倍 (95% CI: 1.564~9.922)。

### 2.3 COMT 1947G/A 各基因型及等位基因在 EMs 组, AM 组和对照组中的频率分布

EMs 组, AM 组各基因型频率分布分别与对照组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ) (表 2), 表明



**图 2** COMT 1947G/A 位点各基因型 (M: marker; 1: AA; 2: GG; 3: GA)

**Figure 2** Each genotype of COMT 1947G/A (M: marker; 1: AA; 2: GG; 3: GA)

### 1.3 统计学方法

本研究所得数据采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计学分析。采用 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验方法

表3 CYP19, COMT 各等位基因在 EMs 组, AM 组及对照组中的频率分布(%)

Table 3 Frequency distribution of CYP19, COMT alleles between EMs group, AM group and control group (%)

组别	等位基因频率		$\chi^2$	P	OR	95%CI
	A	G				
<b>CYP19</b>						
EMs 组	29	31	6.416 <sup>a</sup>	0.011 <sup>a</sup>	2.463 <sup>a</sup>	1.218~4.981
AM 组	46	54	9.887 <sup>a</sup>	0.002 <sup>a</sup>	2.705 <sup>a</sup>	1.444~5.068
对照组	53	23				
<b>COMT</b>						
EMs 组	17	43	0.379 <sup>a</sup>	0.538 <sup>a</sup>	1.274 <sup>a</sup>	0.589~2.755
AM 组	23	77	0.011 <sup>a</sup>	0.915 <sup>a</sup>	0.962 <sup>a</sup>	0.476~1.947
对照组	18	58				

注:<sup>a</sup> vs. 对照组

表4 EMs 组与对照组 CYP19, COMT 突变型和野生型比较 [n(%)]

Table 4 Comparison of mutant and wild type in CYP19, COMT between EMs group and control group [n(%)]

组别	n	CYP19		COMT	
		AG+GG	AA	GA+AA	GG
EMs 组	30	24(80.00)	6(20.00)	14(46.67)	16(53.33)
对照组	38	18(47.37)	20(52.63)	14(36.84)	24(63.16)
$\chi^2$		7.559		0.668	
P		0.006		0.414	
OR		4.444		1.500	
95%CI		1.482~13.326		0.566~3.973	

表5 AM 组与对照组 CYP19, COMT 突变型和野生型比较 [n(%)]

Table 5 Comparison of mutant and wild type in CYP19, COMT between AM group and control group [n(%)]

组别	n	CYP19		COMT	
		AG+GG	AA	GA+AA	GG
AM 组	50	39(78.00)	11(22.00)	20(40.00)	30(60.00)
对照组	38	18(47.37)	20(52.63)	14(36.84)	24(63.16)
$\chi^2$		8.878		0.091	
P		0.003		0.763	
OR		3.939		1.143	
95%CI		1.569~9.992		0.479~2.724	

COMT 1947G/A 位点多态性与 EMs, AM 发病无相关性。EMs 组, AM 组各等位基因频率分布分别与对照组比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ) (表3)。EMs 组, AM 组携带 A 等位基因突变的基因型 GA+AA 分别与野生型 GG 比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ) (表4、表5), 表明与野生型 GG 比较, 携带 A 等位基因的基因型(GA+AA)不能增加 EMs 和 AM 发病风险。

### 3 讨论

EMs 和 AM 均为妇科常见良性疾病, 但具有类似恶性肿瘤远处转移和生长的侵蚀性生物学行为, 迄今

仍无特异性治疗方法。目前, 有关异位子宫内膜的来源, 主要学说有: 子宫内膜种植学说、淋巴及静脉播散学说、体腔上皮化生学说、诱导学说、遗传学说及免疫调节学说等<sup>[4]</sup>, 但每种学说都不能完美解答其发病机制。Bischoff 等<sup>[5]</sup>报道, EMs 和 AM 可能通过多基因或多因素遗传, 且 EMs 是一种多基因性、多因素的疾病, 由多个基因位点与环境、激素、免疫等因素相互作用所致。多数学者认为, 2 种疾病均为雌激素依赖性疾病, 雌激素合成及灭活过程出现失衡, 可致其发生。研究表明, 雌激素代谢过程中, 相关编码基因突变可能对某些良、恶性疾病的遗传易感性起决定性作用<sup>[6]</sup>, 可能引起雌激素代谢障碍, 从而影响肿瘤发生<sup>[7-8]</sup>。CYP19 和 COMT 分别为雌激素合成及代谢过程中的关键酶, 国外文献有对 CYP19 基因 240A/G, COMT 基因 1947G/A 位点单核苷酸多态性与 EMs 和 AM 相关性研究的报道, 而我国仅有对河北省汉族妇女 EMs CYP19 基因多态性<sup>[9]</sup>、河北省和湖南省汉族妇女 EMs 和 AM COMT 多态性<sup>[10]</sup>的相关报道, 而暂无北方地区妇女的相关研究。

本研究结果显示, 山东省滨州地区汉族妇女 CYP19 基因 240A/G 位点各基因型及等位基因分布频率在 EMs 组, AM 组和对照组比较, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ), 其中等位基因 G 突变可使 EMs 发病风险增加 2.463 倍, AM 发病风险增加 2.705 倍。EMs 组, AM 组携带 G 等位基因突变的基因型 AG+GG 分别与野生型 AA 比较, 差异亦有统计学意义( $P < 0.05$ ), 携带 AG 和 GG 基因型的妇女 EMs 发病风险增加 4.444 倍, AM 发病风险增加 3.939 倍。COMT 1947G/A 位点各基因型及等位基因分布频率在 EMs 组, AM 组和对照组比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 说明 COMT 1947G/A 位点多态性与 EMs, AM 发病无相关性。携带 A 等位基因突变的基因型 GA+AA 分别与野生型 GG 比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ ), 携带 A 等位基因的基因型(GA+

AA)不能增加 EMs 和 AM 发病风险。以上结果均与国内外报道一致,对研究不同地区、不同种族 EMs 和 AM 发病的遗传因素及遗传机制具有重要参考价值。但因本研究收集样本时间较短,样本数量较少,可能对 *CYP19* 240A/G 和 *COMT* 1947G/A 位点多态性的研究具有统计学偏差,故需大样本量的随机、双盲对照研究,进行多地区、多种族的统计,以确定 *CYP19* 240A/G 和 *COMT* 1947G/A 位点多态性在 EMs 和 AM 发病中的作用。

### 参 考 文 献

- 1 Kitawaki J, Kado N, Ishihara H, *et al.* Endometriosis: The pathophysiology as an estrogen-dependent disease[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2002, 83(1-5): 149-155.
- 2 Miyoshi T, Iwao K, Ikeda N, *et al.* Breast cancer risk associated with polymorphism in *CYP19* Japanese women[J]. *Int J Cancer*, 2000, 89(4): 325-328.
- 3 Kunuqi H, Nanko S, Ueki A, *et al.* High and low activity alleles of Catechol-O-methyltransferase gene: Ethnic difference and possible association with Parkinson's disease[J]. *Neurosci Lett*, 1997, 221(2-3): 202-204.
- 4 Yue J, ed. *Gynecology and obstetrics*. 7th ed [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008, 325-326. [乐杰,主编. 李攀,顾振鹏,刘顺振,等. *CYP19*, *COMT* 等位基因突变与子宫内膜异位症和子宫腺肌病的相关性研究[J/CD]. 中华妇幼临床医学杂志:电子版,2013, 9(1):60-64.
- 5 Bischoff F, Simpson JL. Genetic basis of endometriosis[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2004, 1034: 284-299.
- 6 Huber JC, Schneeberger C, Tempfer CB. Genetic modelling of the estrogen metabolism as a risk factor of hormone-dependent disorders[J]. *Matufitas*, 2002, 42(1): 1-12.
- 7 Jefcoate CR, Liehr JG, Santen RJ, *et al.* Tissue-specific synthesis and oxidative metabolism of estrogens[J]. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2000, 27: 95-112.
- 8 Thompson PA, Ambrosone C. Molecular epidemiology of genetic polymorphisms in estrogen metabolizing enzymes in human breast cancer[J]. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 2000, 27(6): 125-134.
- 9 Yang X, Chen SQ, Liu M. Association of the *CYP19* gene polymorphism with genetic susceptibility to endometriosis [J]. *Chin J Med Genet*, 2010, 27(6): 692-696. [杨欣,陈素琴,刘萌. *CYP19* 基因多态性与子宫内膜异位症相关性的研究[J]. 中华医学遗传学杂志,2010, 27(6): 692-696.]
- 10 Zhang F, Xue SP, Qu YE. Study on the correlation between gene polymorphism of *COMT* and endometriosis and adenomyosis[J]. *J Hebei Normal Univ: Nat Sci Ed*, 2011, 35(3): 309-312. [张峰,薛素萍,曲银娥. *COMT* 基因多态性与子宫内膜异位症和子宫腺肌病关系研究[J]. 河北师范大学学报:自然科学版,2011, 35(3): 309-312.]

(收稿日期:2012-09-02 修回日期:2012-11-22)

中华医学会