

巨噬细胞移动抑制因子基因多态性与子宫内膜异位症的相关性研究

谷杭芝 林蒙蒙 林蓉蓉 戴张波 胡燕

【摘要】 目的 探讨巨噬细胞移动抑制因子(MIF)基因多态性与子宫内膜异位症遗传易感性的关系。方法 选取卵巢型子宫内膜异位症行腹腔镜手术的患者 150 例作为病例组,同期健康体检者或因其他原因进行腹腔镜手术的患者 150 例作为对照组,采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性分析技术通过外周静脉血检测 MIF-rs4822446 A/G、rs4822443 G/A、rs2012133 G/C 基因多态性,并分析基因多态性与子宫内膜异位症的关系。结果 两组受试者 MIF-rs4822446 A/G 位点的等位基因和基因型频率比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。两组受试者 MIF-rs4822443 G/A 位点的等位基因和基因频率比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),其中携带 A 等位基因的妇女患子宫内膜异位症的风险较携带 G 等位基因的妇女高($OR=1.145, 95\%CI: 1.053\sim 1.246, P < 0.05$)。两组受试者 MIF-rs2012133 G/C 位点的等位基因和基因频率比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),其中携带 C 等位基因的妇女患子宫内膜异位症的风险较携带 G 等位基因的妇女高($OR=1.208, 95\%CI: 1.038\sim 1.407, P < 0.05$)。结论 MIF-rs4822443 G/A、rs2012133 G/C 位点多态性与与子宫内膜异位症遗传易感性有关。

【关键词】 子宫内膜异位症 巨噬细胞移动抑制因子 基因多态性

Relationship between polymorphisms of MIF gene and susceptibility to endometriosis GU Hangzhi, LIN Mengmeng, LIN Rongrong, et al. Department of Gynecology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between the polymorphisms of macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene and genetic susceptibility of endometriosis (EMS). Methods 150 patients with pathologically diagnosed EMS (EMS group) and 150 healthy women or non-EMS female patients (control group) were recruited in the study. The genotypes of MIF-rs4822446 A/G, rs4822443 G/A, rs2012133 G/C were detected by polymorphism chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis, and the relationship between gene polymorphisms and EMS was analyzed. Results There was significant difference in allele distributions of MIF-rs4822443 G/A site between two groups (both $P < 0.05$); compared with the G allele, the A allele significantly increased the risk of developing EMS with an odds ratio of 1.145 (95%CI: 1.053-1.246, $P < 0.05$). There was also significant difference in allele distributions of the MIF-rs2012133 G/C site between two groups (both $P < 0.05$); compared with the G allele, the C allele significantly increased the risk of developing EMS with an odds ratio of 1.208 (95%CI: 1.038-1.407, $P < 0.05$). However, there was no significant difference in allele distribution of MIF-rs4822446 A/G site between two groups ($P > 0.05$). Conclusion The results suggest that MIF-rs4822443 G/A, rs2012133 G/C polymorphisms are associated with the susceptibility to EMS.

【Key words】 Endometriosis Macrophage migration inhibitory factor Polymorphism

子宫内膜异位症是一种常见的妇科疾病,以宫腔以

外部位(卵巢、大网膜、子宫直肠陷凹、腹壁、肺等)的活性子宫内膜细胞增殖、浸润为特点,引起顽固性、进展性、慢性盆腔疼痛,可导致不孕、月经异常等。子宫内膜异位症虽然是一种良性疾病,但也存在恶变的风险^[1]。育龄期妇女子宫内膜异位症发病率接近 5%~10%,而近年来卵巢型子宫内膜异位症发病率有明显上升趋势。手术是治疗子宫内膜异位症的主要手段,但复发率高,严重影响育龄妇女的身心健康。巨噬细胞移动抑制因子

DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.3.2018-303

基金项目:温州市科技计划项目(Y20140125)

作者单位:325000 温州医科大学附属第一医院妇科(谷杭芝、林蓉蓉、胡燕);温州医科大学(林蒙蒙);温州市数字城管信息中心(戴张波)

通信作者:胡燕, E-mail: 627830566@qq.com

(macrophage migration inhibitory factor, MIF) 是一种可溶性细胞因子, 其在子宫内位症患者的腹腔液、血清、异位内膜组织中均呈高表达^[2-4]。本研究采用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性分析 (polymorphism chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis, PCR-RFLP) 技术对 MIF 基因多态性进行分析, 探讨其与子宫内位症遗传易感性的关系, 以期为子宫内位症的发生机制及早期诊断提供依据。

1 对象和方法

1.1 对象 选取 2014 年 3 月至 2015 年 7 月在本院妇科接受腹腔镜手术的卵巢型子宫内位症患者 150 例作为病例组, 术后标本均经病理学检查证实为子宫内位症, 年龄 21~46 岁, 中位年龄 35(26, 37) 岁。选取同期本院健康体检者或因其他原因进行腹腔镜手术的患者 150 例作为对照组, 通过询问既往史结合相关化验检查后排除子宫内位症, 年龄 20~50 岁, 中位年龄 29(25, 36) 岁。两组受试者年龄比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 彼此之间无血缘关系, 无妇科良、恶性肿瘤, 无糖尿病、甲状腺功能异常等内分泌疾病, 家族史中无遗传病, 无肝炎、结核等感染性疾病, 无类风湿性关节炎及其他自身免疫性疾病, 近期未服用过激素类药物。本研究经医院伦理委员会批准和患者本人或其家属同意。

1.2 试剂与仪器 血液基因组 DNA 提取试剂盒、2×Taq PCR MasterMix、50bp DNA ladder、100bp DNA ladder、DNA loading buffer 购自天根生化科技(北京)有限公司, 限制性内切酶 Alu I、Hae III、Hpa II 购自 NEB(北京)有限公司, 紫外分光光度计购自美国 Thermo 公司, 电泳仪购自北京百晶生物技术有限公司, PCR 扩增仪购自德国 Mastercycler Gradient Eppendorf 公司。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 提取 无菌操作下采集外周静脉血至少 5ml, 加入内置有 0.85ml 枸橼酸钠的试管中, 混匀, 放置于 4℃ 冰箱保存备用(1 周内检测)。采用血液基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA。

1.3.2 引物设计 搜索 NCBI 网站, 获取人 MIF 基因的序列及 MIF-rs4822446 A/G、rs4822443 G/A、rs2012133 G/C 位点序列。将 MIF 基因的序列导入 Primer Premier 5 软件中, 使用 Primer 功能设计位于各基因位点上下游的引物序列, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 见表 1。

表 1 各位点引物序列

多态性位点	引物	退火温度(°C)	产物长度(bp)
rs4822446 A/G	上游: 5'-GAGCAGCAGTCCACCATA-3'	58	326
	下游: 5'-CCCAGACTCTTTCCCTCC-3'		
rs4822443 G/A	上游: 5'-GAGCAGCAGTCCACCATA-3'	58	326
	下游: 5'-CCCAGACTCTTTCCCTCC-3'		
rs2012133 G/C	上游: 5'-TGGCTCGACAGTCAACAA-3'	58	793
	下游: 5'-GTCCTCCTACACCTCATCAC-3'		

1.3.3 基因多态性检测 采用 PCR-RFLP 技术检测 MIF-rs4822446 A/G、rs4822443 G/A、rs2012133 G/C 位点基因多态性。PCR 反应体系为 20μl 体系, 其中模板 1μg, 上游引物 1μl, 下游引物 1μl, 2×Taq PCR Master-Mix 10μl, 双蒸水补足至 20μl。酶切体系为: PCR 扩增产物 2.5μl、10×Buffer 1μl、三蒸水 6.3μl、限制性内切酶 0.2μl, 恒温水浴 4h。将酶切产物经琼脂糖凝胶电泳, 电脑成像系统成像分析。各位点限制性内切酶及其酶切产物长度见表 2。

表 2 各位点限制性内切酶及其酶切产物长度

多态性位点	限制性内切酶	酶切位点	酶切产物长度(bp)
rs4822446 A/G	Alu I	5'...AG▼CT...3'	326(GG)
		3'...TC▲GA...5'	200+126(AA)
rs4822443 G/A	Hae III	5'...GG▼CC...3'	326(AA)
		3'...CC▲GG...5'	298+38(GG)
rs2012133 G/C	Hpa II	5'...C▼CGG...3'	793(GG)
		3'...GGC▲C...5'	209+584(CC)

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件。计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示, 组间比较采用 Wilcoxon 符号秩和检验; 计数资料组间比较采用 χ^2 检验; 对照组各位点基因型频率的观察值与预期值行 Hardy-Weinberg 平衡检验。采用 logistic 回归分析计算等位基因和基因型的 OR 值和 95%CI。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对照组 Hardy-Weinberg 平衡检验 对照组 MIF-rs4822446 A/G、rs4822443 G/A、rs2012133 G/C 位点中基因型频率观察值与预期值间均符合 Hardy-Weinberg 平衡(均 $P > 0.05$), 表明本实验对照组资料具有群体代表性。

2.2 酶切结果 MIF-rs4822446 A/G 位点经特异引物进行 PCR 后得到 326bp 大小的 DNA 双链, 经 Alu I 酶切后, GG 型可见 1 条 326bp 大小的条带, AA 型可见 1

条 200bp 和 1 条 126bp 大小的条带,GA 型同时可见上述 3 条条带,见图 1。MIF-rs4822443 G/A 位点经特异引物进行 PCR 后得到 326bp 大小的 DNA 双链,经 Hae III 酶切后,AA 型可见 1 条 326bp 大小的条带;GG 型被酶切成 1 条 298bp 和 1 条 38bp 大小的条带,而 38bp 大小的条带较小,因此在电泳图上 GG 型仅见到 1 条 298bp 大小的条带;GA 型可见 1 条 326bp 和 1 条 298bp 大小的条带,见图 2。MIF-rs2012133 G/C 位点经特异引物进行 PCR 后得到 793bp 大小的 DNA 双链,经 Hpa II 酶切后,CC 型可见 1 条 209bp 和 1 条 584bp 大小的条带,GG 型仅见 1 条 793bp 大小的条带,CG 型同时可见上述 3 条条带,见图 3。

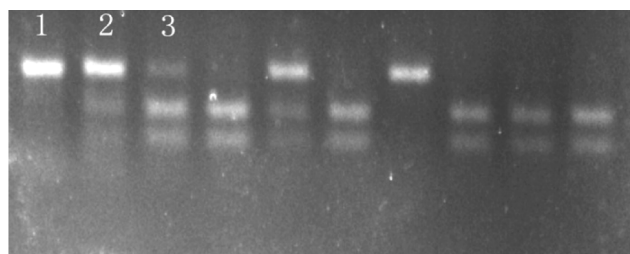


图 1 MIF-rs4822446 A/G 位点酶切产物电泳图(1 为 GG 型;2 为 GA 型;3 为 AA 型)

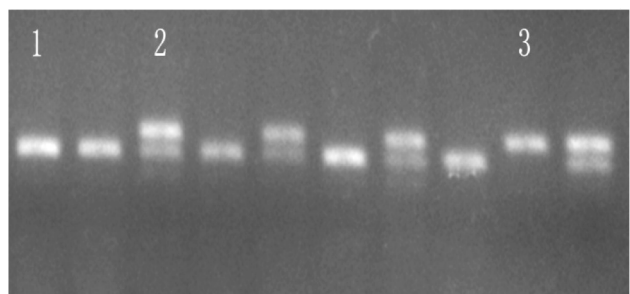


图 2 MIF-rs4822443 G/A 位点酶切产物电泳图(1 为 GG 型;2 为 GA 型;3 为 AA 型)

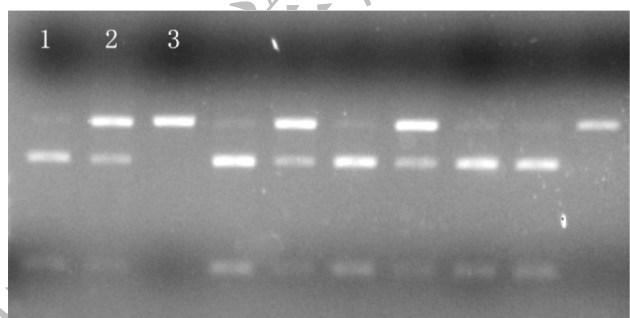


图 3 MIF-rs2012133 G/C 位点酶切产物电泳图(1 为 CC 型;2 为 CG 型;3 为 GG 型)

2.3 两组多态性位点等位基因、基因型频率分布 两

组受试者 MIF-rs4822446 A/G 位点的等位基因和基因型频率比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。两组受试者 MIF-rs4822443 G/A 位点的等位基因和基因频率比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),其中携带 A 等位基因的妇女患子宫内膜异位症的风险较携带 G 等位基因的妇女高($OR=1.145, 95\%CI: 1.053\sim 1.246, P < 0.05$)。两组受试者 MIF-rs2012133 G/C 位点的等位基因和基因频率比较差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),其中携带 C 等位基因的妇女患子宫内膜异位症的风险较携带 G 等位基因的妇女高($OR=1.208, 95\%CI: 1.038\sim 1.407, P < 0.05$),见表 3。

表 3 两组多态性位点等位基因和基因型频率分布比较[例(%)]

组别	n	rs4822446 A/G				
		等位基因		基因型		
		A	G	AA	GG	GA
病例组	150	234(78.00)	66(22.00)	90(60.00)	6(4.00)	54(36.00)
对照组	150	227(75.67)	73(24.33)	90(60.00)	13(8.67)	47(31.33)
χ^2 值		0.459		3.064		
P 值		0.562		0.216		

组别	n	rs4822443 G/A				
		等位基因		基因型		
		G	A	GG	AA	GA
病例组	150	220(73.33)	80(26.67)	85(56.67)	15(10.00)	50(33.33)
对照组	150	252(84.00)	48(16.00)	109(72.67)	7(4.67)	34(22.67)
χ^2 值		10.169		8.926		
P 值		0.002		0.012		

组别	n	rs2012133 G/C				
		等位基因		基因型		
		C	G	CC	CG	GG
病例组	150	156(52.00)	144(48.00)	53(35.33)	50(33.33)	47(31.33)
对照组	150	126(42.00)	176(58.00)	32(21.33)	62(41.33)	56(37.33)
χ^2 值		6.022		7.260		
P 值		0.018		0.027		

3 讨论

子宫内膜异位症目前最经典的病因学说就是 Sampson 提出的经血逆流学说^[5],而在实际的临床观察中发现,接近 90%的育龄期妇女都会出现经血逆流,而只有 10%会发展成子宫内膜异位症^[6]。子宫内膜异位症是一种多基因遗传疾病,携带突变基因的患者子宫内膜细胞更具有黏附和宫外生长的活性^[7]。目前有较多研究将关注点聚焦于 MIF 上,其在子宫内膜异位症发病中作用的研究已日益受到重视。人的 MIF 基因长度 $< 1\text{kb}$,位于 22 号染色体长臂(2Zq11.2)的保守区内,由 3

个外显子和 2 个内含子组成。MIF 含有 115 个氨基酸残基,相对分子质量约为 12.5kDa^[8]。国内外许多研究表明 MIF 在子宫内膜异位症患者的腹腔液、血清、异位内膜组织中均呈高表达^[2-4]。李建等^[9]研究也证实以上观点,并提出血清 MIF 水平在诊断子宫内膜异位症中具有一定价值,与糖类抗原 125 联合检测可提高子宫内膜异位症临床诊断的特异度,有助于疾病的鉴别诊断。

目前 MIF 基因见报道较多的有 4 个多态性位点,它们分别位于启动子区+656 C/G、+254 T/C、-173 G/C 的 3 个单核苷酸多态性位点和-794 的 CATTn(n=5~8)微卫星多态性位点,研究表明 MIF 基因多态性与多种肿瘤的发病风险相关。有关 MIF 基因多态性与子宫内膜异位症的关系研究报道较少。王春平等^[10]研究发现 MIF 基因启动子区-794 CATT 微卫星多态性与广东汉族人群子宫内膜异位症的遗传易感性相关,且 CATT(5/5)基因型及 CATT(5)等位基因型可能是其易感基因型。于雅等^[11]研究发现 MIF 基因启动子区+254 T/C 位点多态性与子宫内膜异位症发生的易感性有关,而 C 等位基因可能是其发生的遗传易感标志。石瑾秋等^[12]研究发现 MIF 基因启动子区-173 位点多态性与湖南汉族人群子宫内膜异位症的遗传易感性相关,其 CC 基因型可能是其易感基因。以上研究均提示 MIF 基因多态性与子宫内膜异位症的遗传易感性有关。然而不同研究者得出不同的基因多态性位点均可能是子宫内膜异位症的易感基因,为进一步补充研究 MIF 基因多态性与子宫内膜异位症的遗传易感性关系,本研究从 MIF-rs4822446 A/G、rs4822443 G/A、rs2012133 G/C 3 个位点的多态性出发,通过 PCR-RFLP 技术发现 MIF-rs4822443 G/A 和 MIF-rs2012133 G/C 位点多态性与子宫内膜异位症的发病风险有关,而 MIF-rs4822446 A/G 位点多态性与子宫内膜异位症的发病风险无关。MIF-rs4822446 A/G 位点 A 等位基因可能不是子宫内膜异位症的易感基因。MIF-rs4822443 G/A 位点携带有 A 等位基因的妇女患有子宫内膜异位症的风险是携带 G 等位基因妇女的 1.145 倍。MIF-rs2012133 G/C 位点携带有 C 等位基因的妇女患有子宫内膜异位症的风险是携带 G 等位基因妇女的 1.208 倍。

综上所述,本研究证实 MIF-rs4822443 G/A、rs2012133 G/C 位点多态性与子宫内膜异位症遗传易感性有关,为临床筛选高风险妇女提供了检测依据。MIF-rs4822443 G/A 位点携带有 A 等位基因和 MIF-rs2012133 G/C 位

点携带有 C 等位基因的妇女 MIF 基因表达是否异常,是否与子宫内膜异位症的发病机制有关,有待进一步研究证实。

4 参考文献

- [1] 王倩男,李沛霖,王建玲,等.子宫内膜异位症恶变的临床研究进展[J].浙江医学,2017,39(7):585-588. DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2017.39.7.2016-2034.
- [2] 俞丹华.巨噬细胞移动抑制因子、血管生成素-2、血管内皮生长因子在子宫内膜异位症中的意义[J].临床和实验医学杂志,2015,14(2):101-103. DOI:10.3969/j.issn.1671-4695.2015.02.008.
- [3] Mahdian S, Aflatoonian R, Yazdi RS, et al. Macrophage migration inhibitory factor as a potential biomarker of endometriosis[J]. Fertility and Sterility, 2015, 103(1): 153-159. DOI:10.1016/j.fertnstert.2014.09.031.
- [4] Rakhila H, Girard K, Lebœuf M, et al. Macrophage migration inhibitory factor is involved in ectopic endometrial tissue growth and peritoneal-endometrial tissue interaction in vivo: a plausible link to endometriosis development[J]. PLoS One, 2014, 9(10): e110434. DOI:10.1371/journal.pone.0110434.
- [5] Sampson JA. Metastatic or embolic endometriosis, due to the menstrual dissemination of endometrial tissue into the venous circulation[J]. Am J Pathol, 1927, 3(2):93-110.
- [6] Strathy JH, Molgaard CA, Coulam CB, et al. Endometriosis and infertility: a laparoscopic study of endometriosis among fertile and infertile women[J]. Fertil Steril, 1982, 38(6): 667-672. DOI:10.1016/S0015-0282(16)46691-4.
- [7] Steele RW, Dmowski WP, Marmer DJ. Immunologic aspects of human endometriosis[J]. Am J Reprod Immunol, 1984, 6(1):33-36. DOI:10.1111/j.1600-0897.1984.tb00106.x.
- [8] Larson DF, Horak K. Macrophage migration inhibitory factor: controller of systemic inflammation[J]. Crit Care, 2006, 10(2):138. DOI:10.1186/cc4899.
- [9] 李建,胡玉红.血清 MIF 在子宫内膜异位症中临床应用价值[J].牡丹江医学院学报,2016,37(3):16-18. DOI:10.13799/j.cnki.mdjyxyxb.2016.03.006.
- [10] 王春平,秦成路,周芸,等. MIF 基因启动子区-794CATT 微卫星多态性与子宫内膜异位症相关性研究[J].中国妇幼保健,2011,26(7):1086-1089.
- [11] 于雅,袁清连,王春平,等. MIF 基因多态性与子宫内膜异位症的相关性[J].中国热带医学,2013,13(5):625-628. DOI: 10.13604/j.cnki.46-1064/r.2013.05.040.
- [12] 石瑾秋,张怡.巨噬细胞移动抑制因子-173 位点单核苷酸多态性与子宫内膜异位症关系的研究[J].实用妇产科杂志,2010,26(9):668-671.

(收稿日期:2018-01-27)

(本文编辑:陈丽)