

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2004)23-2124-03

## 陕西汉族人群 ER 基因扩增片段酶切长度多态性

李军林<sup>1</sup>, 舒青<sup>1</sup>, 郑强荪<sup>2</sup>, 冯蕾<sup>1</sup>( <sup>1</sup>第四军医大学基础部遗传与发育生物学教研室 陕西 西安 710033, <sup>2</sup>第四军医大学唐都医院心脏内科 陕西 西安 710038 )

### Estrogen receptor polymorphism in Han population of Shaanxi Province

Li Jun-Lin<sup>1</sup>, SHU Qing<sup>1</sup>, ZHENG Qiang-Sun<sup>2</sup>, FENG Lei<sup>1</sup><sup>1</sup>Department of Medical Genetics and Development Biology School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China, <sup>2</sup>Department of Cardiology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China

**【Abstract】** AIM: To study the distribution of ER intron 1 polymorphism in Han population of different ages and sexes in Shaanxi Province. **METHODS:** Amplification-Restriction Fragment length Polymorphism (Amp-RFLP) was used to analyze the polymorphism of Han population in Shaanxi Province. The templates of PCR were extracted from 162 independent cases of different ages and sexes in Shaanxi Province. **RESULTS:** ① The full length of ER intron 1 after PCR was 1.3 kb. ② Using restriction endonuclease enzymes, three types of genotypes were obtained: Pvu II: P/P (1.3 kb), P/p (1.3 kb, 850 and 450 bp) and p/p (850 bp, 450 bp). ③ Using restriction endonuclease enzymes, another three types of genotypes were obtained: Xba I: X/X (1.3 kb), X/x (1.3 kb, 910 and 390 bp) and x/x (910 bp, 390 bp). **CONCLUSION:** It is suggested that ER gene intron 1 of Han population in Shaanxi Province is polymorphism. The distribution of the genotype is not related to different age groups and different gender groups.

**【Keywords】** ER gene; gene polymorphism; Han population in Shaanxi province

**【摘要】**目的: 分析陕西省不同年龄和不同性别的汉族人群雌激素受体(ER)基因1号内含子基因多态性分布情况。方法: 研究基于PCR后Pvu II和Xba I的酶切结果。PCR模板DNA来自陕西省162例无关个体, 研究对象分为不同年龄和不同性别两组。结果: ①PCR扩增ER基因的DNA片段长度为1.3 kb; ②经Pvu II酶切, 得到3种ER基因型: P/P型(1.3 kb), P/p型(1.3 kb, 850和450 bp), p/p型(850和450 bp);

收稿日期 2004-04-06; 修回日期 2004-09-14

基金项目 国家自然科学基金(39700165)

通讯作者 舒青, Tel. (029) 83374490 Email. QingShu@fmmu.edu.cn

作者简介 李军林(1972-), 男, 汉族, 陕西省眉县人, 讲师, Tel.

(029) 83374490 Email. lijunlin1905@163.com

③经Xba I酶切得到的3种1号内含子基因型为: X/X型(1.3 kb), X/x型(1.3 kb, 910和390 bp)和x/x型(910和390 bp)。结论: 在陕西汉族非相关正常人群中ER基因1号内含子存在多态性, 基因型分布与年龄和性别不存在相关性。

**【关键词】** 雌激素受体基因; 基因多态性; 陕西汉族人群**【中图分类号】** Q75 **【文献标识码】** A

### 0 引言

限制性片段长度多态性在基因组中普遍存在, 据估计, 人体基因组中平均异质性约为1%~5%。基因位点的多态性会影响基因的转录表达, 进而通过影响基因产物来影响相关的生理功能<sup>[1]</sup>。在对动脉粥样硬化遗传易感性研究过程中, 发现女性在绝经前发病率明显低于男性, 但绝经后与男性发病率相近, 而动脉粥样硬化与雌激素的关系表明女性通过雌激素受体途径拮抗动脉粥样硬化。我们采用Amp-RFLP技术对陕西汉族正常人群的雌激素受体基因(estrogen receptor gene, ER gene)多态性分布进行初步研究, 希望有助于从DNA水平更深入地了解ER基因多态性是否存在性别差异和年龄变化, 以及相关疾病发生机制。

### 1 对象和方法

**1.1 对象** 随机抽取162(男98, 女64)例体质健康个体外周血血样, 均为陕西省无血缘关系人群。

**1.2 方法** 对162例研究对象按照年龄和性别分为: 少年组(7~18岁)37例, 成年组(19~40岁)72例, 老年组(60~74岁)53例; 按照性别分为男女两组, 男98例, 女64例。分别取静脉血3~5 mL, 生理盐水洗去血浆, 加入STE, SDS和蛋白酶K, 37℃过夜消化, 酚/氯仿/异戊醇(体积比为25:24:1)抽提, 无水乙醇和醋酸钠沉淀, 制备基因组DNA。引物序列分别为: 5'-CTGCCACCCTATCTGTATCTTTTCCTATTCTCC-3', 5'-TCTTTCTCTGCCACCCTGGCGTTCGATTATCTGA-3'。PCR反应体系50 μL, 依次加入灭菌双蒸水32 μL, 10×Buffer(含Mg<sup>2+</sup>)5 μL, 2.5 mmol/L dNTP 4 μL, 引物各2.5 μL, 模板DNA 3 μL, 97℃预变性7 min, 加入Tag酶1 μL(4 mmol/L), 94℃变性30 s,

61℃复性 40 s,72℃延伸 90 s,共 30 个循环,循环结束后 72℃延伸 10 min. 取 PCR 扩增产物 8 μL,14 g/L琼脂糖凝胶 30 mA 电泳 30 min,观察 PCR 结果. 取 20 μL PCR 扩增产物,无水乙醇和醋酸钠沉淀,晾干后加入灭菌双蒸水 15.5 μL 溶解,加入 Buffer B 2 μL,Acetylated BSA 2 μL 和 6 U *Pvu* II 和 *Xba* I 于 37℃分别酶切 3~4 h. 酶切产物经 15 g/L 琼脂糖凝胶(含溴乙锭)电泳分离,在紫外灯下判读并照相记录结果.

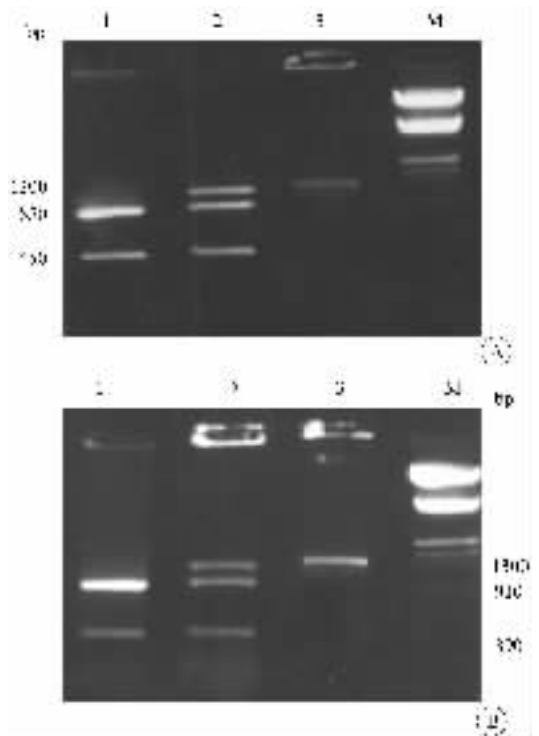
统计学处理:基因频率用直接算法,并按 Hardy-Weinberg 平衡原理确认样本的群体代表性. 不同年龄、性别间等位基因频率差异用  $\chi^2$  检验.

## 2 结果

在正常人群中 ER 基因 1 号内含子分别存在 3 种等位基因片段:P/P,P/p,p/p,X/X,X/x 和 x/x 型,琼脂糖凝胶电泳显示分别为 1 条、3 条和 2 条带,大写字母表示存在点突变而使该酶切位点消失,小写字母则表示存在该酶切位点. 陕西汉族正常人群 ER 基因 1 号内含子经 PCR 后结果为 1.3 kb 大小的 1 条带,经 *Pvu* II 酶切可区分出 3 种基因型:P/P 型(1.3 kb)P/p 型(1.3 kb,850 和 450 bp),p/p 型(850 和 450 bp)(Fig 1A). *Xba* I 内切酶区分出的 3 种基因型分别为:X/X 型(1.3 kb)X/x 型(1.3 kb,910 和 390 bp)和 x/x 型(910 和 390 bp)(Fig 1B). 陕西汉族人群中 ER 基因 1 号内含子 PCR 片段为 1.3 kb,经 *Pvu* II 和 *Xba* I 酶切,以 P/p 和 x/x 基因型分布最为广泛. 经 *Pvu* II 酶切基因频率分布范围为 0.08~0.57,经 *Xba* I 酶切基因频率分布范围为 0.05~0.53. P 基因频率为 0.35,p 基因频率为 0.65,X 基因频率为 0.28,x 基因频率为 0.72. 不同年龄组之间 ER 基因 *Pvu* II 酶切多态性分布无统计学差异( $\chi^2 = 0.648, P > 0.95$ ),*Xba* I 酶切多态性分布无统计学差异( $\chi^2 = 2.365, P > 0.50$ , Tab 1). 性别之间差异也不显著:ER 基因 *Pvu* II 酶切多态性分布差异( $\chi^2 = 0.621, P > 0.70$ ),*Xba* I 酶切多态性分布差异( $\chi^2 = 0.599, P > 0.70$ , Tab 2). 即 ER 基因 PCR 扩增片段 *Pvu* II 与 *Xba* I 酶切多态性与年龄和性别不存在相关性.

## 3 讨论

ER 基因位于 6q24-27,野生型全长 140 kb. 其 1 号内含子有两个高度多态性的 AFLP 位点,因其特殊位置可能会影响基因转录,所以引起研究者的关注. Ushiroyama 等<sup>[2]</sup>对日本 42~46 岁绝经后妇女的骨矿密度与雌激素受体基因 1 号内含子多态性关系研究,



A(*Pvu* II):1 p/p 2:P/p 3:P/P M:marker. B(*Xba* I):1 x/x 2:X/x 3:X/X M:marker.

Fig 1 Results of *Pvu* II and *Xba* I restriction after PCR in ER gene intron 1

图 1 ER 基因 1 号内含子 PCR 扩增后 *Pvu* II 和 *Xba* I 酶切结果

表 1 不同年龄组 ER 基因 1 号内含子 *Pvu* II 和 *Xba* I 酶切结果

Tab 1 Distribution of ER gene *Pvu* II and *Xba* I AFLP among different ages groups

Group	n	Frenquence of genotype					
		P/P	P/p	p/p	X/X	X/x	x/x
Youth(7-18)	37	0.08	0.57	0.35	0.13	0.38	0.49
Adult(19-40)	72	0.08	0.50	0.42	0.05	0.42	0.53
Elder(60-74)	53	0.09	0.52	0.39	0.09	0.43	0.48

表 2 不同性别 ER 基因的内含子 *Pvu* II 和 *Xba* I 酶切结果

Tab 2 Distribution of ER gene *Pvu* II and *Xba* I AFLP among different sexual groups

Group	n	Frenquence of genotype					
		P/P	P/p	p/p	X/X	X/x	x/x
Male	98	0.09	0.50	0.41	0.07	0.45	0.48
Female	64	0.07	0.55	0.38	0.05	0.43	0.52

发现骨矿密度与基因型之间的差异型:PPXx 杂合子基因型个体的骨矿密度明显偏低,但与其他基因型无显著关联;Sapir-Koren 等<sup>[3]</sup>对 183 例 18~84 岁的男性和 161 例 23~79 岁女性进行骨矿密度和 ER 基因

多态性相关性研究,发现男性 ER 基因多态性与骨矿密度存在相关性趋势,但不存在显著的统计学意义,女性 ER 基因多态性与骨矿密度之间无相关性。Matsushita 等<sup>[4]</sup>对 133 例怀孕妇女骨矿密度与 ER 关系研究揭示两者之间存在相关性。在对动脉粥样硬化遗传易感性研究过程中,我们发现女性在绝经前发病率明显低于男性,但绝经后与男性发病率相近<sup>[5]</sup>,而雌激素的分泌与年龄不存在相关性<sup>[6]</sup>。本研究结果显示,从少年组到老年组,ER 基因 1 号内含子 Pvu II 和 Xba I 两个与动脉粥样硬化遗传易感性相关的位点均有多态性分布,P/P,X/X 较少见,P/p 和 x/x 基因型分布频率较高,结果与日本人种群基因频率相似<sup>[2,3]</sup>,ER 基因在正常男性和正常女性中分布频率极为相近,不存在性别差异。ER 基因 1 号内含子 Pvu II 和 Xba I 两个研究位点不存在变化,说明在不同性别和不同年龄组之间,对动脉粥样硬化遗传易感性的敏感性和替代疗法存在的差异与其他限制性酶切位点可能存在相关性。结合 Shiozawa 等<sup>[7]</sup>实验,说明也可能与其他位点或者与 ER 基因其他的多态性形式如甲基化等相关。

## 【参考文献】

- [1] Urakami K, Wada I, Adachi Y, et al. Estrogen receptor gene polymorphisms in patients with Alzheimer's disease, vascular dementia and alcohol-associated dementia [J]. *Dement Geriatr Cogn Disord* 2000 11(3): 119-122.
- [2] Ushiroyama T, Heishi M, Higashio S, et al. The association between postmenopausal vertebral bone mineral density and estrogen receptor gene alleles in ethnic Japanese living in western Japan [J]. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 2001 109(1-2): 15-24.
- [3] Sapir-Koren R, Livshits G, Landsman T, et al. Bone mineral density is associated with estrogen receptor gene polymorphism in men [J]. *Anthropol Anz*, 2001 59(4): 343-353.
- [4] Matsushita H, Kurabayashi T, Tomitani M, et al. Effects of vitamin D and estrogen receptor gene polymorphisms on the changes in lumbar bone mineral density with multiple pregnancies in Japanese women [J]. *Hum Reprod* 2004 22(3): 241-247.
- [5] 郑强莉,舒青,冯蕾,等. 动脉粥样硬化遗传易感性与 HUMARA 多态性的相关性 [J]. 第四军医大学学报, 2001 22(17): 1590-1593.
- [6] Zheng QS, Shu Q, Feng L, et al. Relationship between HUMARA STR polymorphism and atherosclerosis susceptibility [J]. *J Fourth Mil Med Univ* 2001 22(17): 1590-1593.
- [7] Oettel M. Is there a role for estrogens in the maintenance of men's health [J]. *Aging Male* 2002 5(4): 248-257.
- [8] Shiozawa T, Itoh K, Horiuchi A, et al. Down-regulation of estrogen receptor by the methylation of the estrogen receptor gene in endometrial carcinoma [J]. *Anticancer Res* 2002 22(1A): 139-143.

编辑 甄志强

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2004)23-2126-01

## 肝动脉和脾动脉双栓塞治疗肝癌伴脾亢 32 例

王志学 张素芳 周青 赵锡立

(河南大学第一医院放射科,河南开封 475001)

【关键词】肝癌伴脾亢 部分脾栓塞 介入治疗

【中图分类号】R735.7 【文献标识码】B

1 临床资料 肝癌伴脾亢患者 32 例(男 23 例,女 9 例),年龄 37~65 岁。肿块直径 3~11 cm。AFP < 20 μg/L 者 3 例,20~400 μg/L 者 11 例,400~2500 μg/L 18 例。术前外周血白细胞平均值为  $2.9 \times 10^9/L$ ,血小板平均值为  $57.6 \times 10^9/L$ ,具有明确的脾功能亢进征象。肝功能改良 Child A 级 18 例, B 级 10 例, C 级 4 例。采用 Seldinger 技术行腹主动脉造影后,对肿块可供血动脉如肝动脉、肠系膜上动脉、膈动脉及胃左动脉等选择性造影,对供血动脉尽可能作节段性栓塞。栓塞剂为超液化碘油和化疗药物之混悬液,其中 400 g/L 碘油 5~20 mL,表阿霉素 40~60 mg,卡铂 300~400 ng,直至肿瘤血管和肿瘤染色完全或大部分消失。期间灌注 5-FU 500~1000 mg。对肝动-静脉瘘者,化疗药半量灌注后行明胶海绵或钢圈堵塞。根据造影

情况行单纯灌注或碘油栓塞。经脾动脉造影后,了解脾脏大小及血管情况,灌注庆大霉素 2.4 Mu 后,以 10 mm × 10 mm 之明胶海绵或 PVA 颗粒栓塞脾动脉达脾脏的 1/3 范围。在进行第 2 次肝动脉化疗栓塞时,如仍有脾功能亢进及门脉高压征象,还可进行第 2 次脾动脉栓塞,本组 9 例 2 次栓塞,总面积控制在 50%~70% 范围内。栓塞后常规应用抗生素及对症治疗。肝动脉栓塞 2~6 次(平均 3.8)次,出现左上腹疼痛 29 例,发热 7~42(平均 15.8)d 26 例,体温 37.2~38.9℃,其中剧烈疼痛高热 6 例,腹腔积液 3 例。术后 4 wk 26 例外周血白细胞计数升高至  $4 \times 10^9/L$ ,血小板  $80 \times 10^9/L$ 。随访 1~3 a,存活 0.5 a 以上者 25 例,1 a 以上者 12 例,3 a 以上者 2 例。食管胃底静脉曲张改善者 9 例。

2 讨论 原发性肝癌在众多的姑息治疗中,肝动脉化疗栓塞术(TACE)是最有效的治疗方法之一<sup>[1,2]</sup>。肝癌合并脾功能亢进时,同时采用部分脾动脉栓塞术,既缓解了脾亢症状,又为肝癌患者的化疗提供了有利条件,体现了明显的优越性<sup>[3]</sup>。严格掌握适应证和控制脾脏栓塞面积是减少并发症的重要因素。

## 【参考文献】

- [1] 南克俊, 随晨光, 魏永长, 等. 中晚期肝癌介入化疗术的愈后影响因素 [J]. 第四军医大学学报, 2002 23(12): 1134-1136.
- [2] 金 刚, 李丽平, 王 微, 等. 肝动脉化疗栓塞治疗中晚期肝癌的临床分析 [J]. 中国肿瘤临床 2001 28(10): 750-752.
- [3] 王艳青, 孟庆江, 史庆辉, 等. 肝癌介入放射治疗的护理 [J]. 第四军医大学学报 2001 22(14): 1933.

编辑 潘伯荣

收稿日期 2004-04-26; 修回日期 2004-06-04

作者简介 王志学(1963-)男(汉族),河南省开封市人,学士,主治医师。Tel.(0378)5661825 Email.wangzhixue1963@sina.com