

脂紊乱。本研究结果显示,大部分 CHF 组患者基因型为 CT 或 TT,且其携带 T 等位基因频率明显高于健康对照组,其患病风险也明显增加。提示 IL-1 β -511C/T 多态性与 CHF 发病具有一定相关性,等位基因 T 可能为 CHF 发病易感基因,其机理可能与该位点 DNA 变异、影响 IL-1 β 分泌、加重炎症反应有关。

参考文献

[1] Biasucci LM, Santamaria M, Liuzzo G. Inflammation, arteriosclerosis and acute coronary syndromes [J]. *Minerva Cardioangiol* 2002, 50: 475 - 486.
 [2] Meisel P, Siegemund A, Grimm R, et al. The interleukin-1 polymor-

phism, smoking and the risk of periodontal disease in the population-based SHIP study [J]. *J Dent Res* 2003 82: 189 - 193.
 [3] Lin YH, Huang P, Lu X, et al. The relationship between IL-1 gene polymorphism and marginal bone loss around dental implants [J]. *J Oral Maxillofac Surg* 2007 65: 2340 - 2344.
 [4] Di Bari M, Pozzi C, Cavallini MC, et al. The diagnosis of heart failure in the community: comparative validation of four sets of criteria in unselected older adults: the ICARE Dicomano Study [J]. *J Am Coll Cardiol* 2004 44(8): 1601 - 1608.
 [5] 尹丽媛,李秀兰,林莉,等. IL-1B ~ (+ 3953) 等位基因 2 多态性与中重度成人牙周炎遗传易感性的相关性分析 [J]. *中国公共卫生* 2001, 17(6): 497 - 498.
 [6] 张源明,钟良军,何秉贤,等. 白细胞介素 1 β 基因启动子区-511 位点 C/T 基因多态性与冠心病严重程度的相关性 [J]. *中华医学遗传学杂志* 2006 23(1): 86 - 88.

收稿日期: 2011-10-18

(解学魁编辑 周欣琳校对)

• 实验研究 •

CYP1A1 和 CYP1B1 基因多态性与 RPL 易感性*

朱壮彦¹, 赵富玺², 高晓敏¹, 穆雅琴², 畅学艳¹

摘要:目的 探讨 CYP1A1、CYP1B1 基因多态性与复发性流产(RPL)遗传易感性关系,为预防和治疗该病提供新靶点。方法 本研究采用等位基因特异性 PCR(As-PCR)和聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法,针对 CYP1A1 基因 MspI 酶切位点和 CYP1B1 L432V 多态位点,检测 81 例患有原因不明 RPL 病例组和 98 名有生育史健康女性对照组之间差异。结果 RPL 组和对对照组 CYP1A1 MspI 位点 3 种基因型 m1/m1、m1/m2、m2/m2 分布频率差异无统计学意义($\chi^2 = 0.335, P > 0.05$); CYP1B1 L432V 多态位点 3 种基因型 C/C、C/G、G/G 在病例组和对对照组分布差异有统计学意义($\chi^2 = 7.467, P < 0.05$); 2 组间 C、G 等位基因分布差异有统计学意义($\chi^2 = 9.129, P = 0.003$); G/G、C/G 基因型与 C/C 基因型比较, RPL 危险度分别提高 2.620、1.954 倍;等位基因 G 使 RPL 危险性增加 2.038 倍。结论 CYP1B1 L432V 突变基因型增加 RPL 发病风险,尚不能认为 CYP1A1 基因 MspI 位点多态性与 RPL 易感性有关。

关键词: 复发性流产(RPL); CYP 基因多态性; 等位基因特异性 PCR(AS-PCR)方法; 聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP); 危险因素

中图分类号: R 714.21

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)12-1607-03

Relationship between polymorphisms of CYP1A1, CYP1B1 genes and susceptibility to recurrent abortion

ZHU Zhuang-yan*, ZHAO Fu-xi, FU Xiao-min, et al. (* Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Shanxi Datong University, Datong, Shanxi Province 037009, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between polymorphisms of CYP1A1 and CYP1B1 genes and the susceptibility to recurrent pregnancy loss (RPL). **Methods** The MspI polymorphism of CYP1A1 and the polymorphism in exon 3 codon 432 (C-G of CYP1B1) were detected with the methods of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and allele specific-PCR (AS-PCR) in a case-control study including 81 cases of RPL and 98 healthy controls. **Results** There was no significant correlation between MspI polymorphism and RPL susceptibility ($\chi^2 = 0.335, P = 0.846$). There were significant differences in the genotype distributions or allele frequencies of CYP1B1 L432V polymorphism between the two groups ($\chi^2 = 7.467, P = 0.024; \chi^2 = 9.129, P = 0.003$). Compared with wild-type C/C, the susceptibility of recurrent abortion with the genotypes of homozygotic mutation G/G and heterozygotic mutation C/G were increased by 2.620 and 1.954 times, respectively. Compared with allele C, the risk of recurrent abortion with allele G was increased by 2.038. **Conclusion** The gene polymorphism of CYP1B1 in exon 3 codon 432 (C-G) might be a genetic risk factor of RPL and the allelic polymorphism of CYP1B1 L432V increases the risk of recurrent abortion. The results do not show that polymorphism of MspI is associated with the susceptibility of RPL.

Key words: RPL; CYP polymorphism; AS-PCR; PCR-RFLP; risk factor

* 基金项目: 国家人口计生委资助项目(200940号 C-73)

作者单位: 1. 山西大同大学医学院妇产科, 山西大同 037009; 2. 山西大同大学医学院免疫学研究所
 作者简介: 朱壮彦(1975-), 女, 山西大同人, 副教授, 博士, 研究方向: 生殖医学、妇科肿瘤学。

习惯性流产指自然流产连续发生 ≥ 3 次者,近年国际上常用复发性流产(recurrent pregnancy loss, RPL)取代习惯性流产,改为连续 ≥ 2 次的自然流产^[1]。RPL 临床发病率约 2%~3%, 50% 原因不明者可能与基因缺陷有关,其研究已成为生殖医学研究热点和难点。研究证实细胞色素 P450 酶系(cytochrome P450, CYP) 中基因多态性与激素相关性癌症遗传易感性相关^[2-4],但国内 CYP 酶系基因多态性与 RPL 方面研究较少。本研究针对不明原因 RPL 进行基因水平探讨,拟通过病例对照研究证实 CYP1A1 m1/m2 多态性及 CYP1B1 L432V 多态性是否与中国华北地区人群中 RPL 相关。

1 材料与方法

1.1 研究对象 RPL 组 81 例,分别来自 2008 年 6 月—2010 年 6 月在大同市第一、第三人民医院妇科和不孕不育诊疗中心就诊的 RPL 患者,年龄 22~37 岁,平均年龄为(29 ± 2.07) 岁,自然流产史 ≥ 2 次,经临床确诊排除生殖器官解剖畸形、内分泌失调等,夫妻双方外周血染色体核型正常,无家族遗传史,配偶相关指标检查无异常。对照组为同期在大同市第一、第三人民医院产科住院的 98 名健康女性,年龄 24~32 岁,平均年龄为(28 ± 1.36) 岁,排除自然流产、宫内死胎和妊娠期高血压疾病等不良妊娠史。病例组和对照组间年龄、家族遗传史、体质指数等无差异。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 2 组女性均在清晨抽取空腹外周静脉全血 3 mL,柠檬酸钠抗凝, -80 °C 保存备用。Promega 公司 DNA 提取试剂盒抽提外周血 DNA, 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 DNA 产物,紫外分光光度计 $A_{260}/A_{280} > 1.8$ 确定 DNA 纯度。

1.2.2 CYP1A1 基因 MspI 酶切位点多态性检测 采用聚合酶链反应-限制性片断长度多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 技术对 CYP1A1 MspI 位点进行多态性分析。根据文献[5]设计引物, MspI 多态性引物序列为上游: 5'-TAG GAG TCT TGT CTC ATG CCT-3', 下游: 5'-CAG TGA AGA GGT GTA GCC GCT-3', PCR 反应条件: 总体积 50 μ L, 含有 50 mmol/L PCR 反应缓冲液, 200 μ mol/L dNTP, 上下游引物各 0.4 μ mol/L, 1 U TaqDNA 聚合酶(Promega 公司) 模板 0.5~0.8 ng。扩增参数为: 95 °C 预变性 5 min, 然后 94 °C 60 s, 60 °C 60 s, 72 °C 60 s, 35 个循环, 最后 72 °C 8 min 孵育。PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定(含 0.5 μ g/mL 溴化乙锭), 电压 80 V, 电流 20 mA, 电泳 30 min。产

物长度 343 bp。取 10 μ L PCR 产物, 加 10 U MspI 限制性内切酶, 37 °C 水浴 4 h。酶切产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 在紫外反射透射仪上观察酶切图谱判定基因型结果。

1.2.3 CYP1B1 L432V 多态位点检测 采用等位基因特异性 PCR(allele-specific PCR, As-PCR) 对同一份 DNA 样品分别进行 2 次 PCR 扩增反应。共同 5'引物 5'-ATG CGC TTC TCC AGC TTT GT-3', 与 Leu 引物 5'-TCC GGG TTA GGC CAC TTC AG-3' 和 Val 引物 5'-TCC GGG TTA GGC CAC TTC AC-3' 组成 2 对引物^[6] 分别对同一样品进行 PCR 扩增(上海英骏生物技术有限公司合成)。PCR 反应总体积 50 μ L, 含有 50 mmol/L PCR 反应缓冲液, 200 μ mol/L dNTP, 上下游引物各 0.4 μ mol/L, 1 U TaqDNA 聚合酶, 模板 0.5~0.8 ng。扩增参数为: 95 °C 预变性 5 min, 然后 94 °C 60 s, 60 °C 60 s, 72 °C 60 s, 35 个循环, 最后 72 °C 8 min 孵育。PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 电压 80 V, 电流 20 mA, 电泳 30 min。

1.2.4 测序 PCR 产物经 Andy Bio PCR 产物回收试剂盒回收, 送公司进行序列测定, 用 oligo 6.0 软件与 Genebank 中的 CYP1A1 和 CYP1B1 基因序列进行比对, 碱基改变与不同引物 PCR 结果相吻合。

1.3 统计分析 数据用 SPSS 13.0 软件进行统计分析。基因型与 Hardy-Weinberg 平衡的符合程度、2 组间等位基因及基因型频率比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CYP1A1 MspI 位点基因频率及基因型分布(表 1) 酶切产物电泳结果显示, CYP1A1 基因 PCR 经 MspI 酶切后分出 3 种基因型: 无 MspI 酶切位点的等位基因 m1 纯合基因型 m1/m1(野生型)(343 bp) DNA 条带; 有 MspI 酶切位点等位基因 m2 纯合基因型 m2/m2(突变型)(200、143 bp) 2 条 DNA 条带; m1 和 m2 杂合基因型 m1/m2(杂合型), 可见 340、200、140 bp 3 条 DNA 条带。CYP1A1 MspI 酶切位点 3 种基因型在 RPL 组及对照组分布差异无统计学意义($\chi^2 = 0.335, P > 0.05$)。

表 1 RPL 组和对照组 CYP1A1 基因 MspI 位点多态性频率分布比较

| 组别 | 人数 | m1/m1 | % | m1/m2 | % | m2/m2 | % | χ^2 值 | P 值 |
|-------|-----|-------|------|-------|------|-------|------|------------|-------|
| RPL 组 | 81 | 37 | 45.7 | 33 | 40.7 | 11 | 13.6 | 0.335 | 0.846 |
| 对照组 | 98 | 49 | 50.0 | 37 | 37.8 | 12 | 12.2 | | |
| 合计 | 179 | 86 | 48.0 | 70 | 39.1 | 23 | 11.7 | | |

2.2 CYP1B1 L432V 基因频率及基因型分布(表 2、3) 密码子 432 基因扩增产物为 149 bp。病例组和对照组间,CYP1B1 基因密码子 432 基因型 C/C 型、G/G 型、C/G 型和 C、G 等位基因分布频率均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。2 组间 3 种基因型和 C、

G 等位基因分布差异有统计学意义($\chi^2 = 7.467$ 、 9.129 $P < 0.05$)。与野生 C/C 基因型比较 纯合突变 G/G 基因型、杂合 C/G 基因型 RPL 危险度分别提高 2.620 和 1.954 倍;等位基因 G 使 RPL 发生危险性增加 2.038 倍。

表 2 RPL 组和对照组 CYP1B1 L432V 多态性基因型频率分布比较

| 组别 | 人数 | C/C(亮氨酸) | | C/G(亮氨酸/缬氨酸) | | G/G(缬氨酸) | | 合计 | |
|------------|----|----------|------|--------------------|------|--------------------|------|----|-------|
| | | n | % | n | % | n | % | n | % |
| RPL 组 | 81 | 37 | 45.7 | 29 | 35.8 | 15 | 18.5 | 81 | 100.0 |
| 对照组 | 98 | 64 | 65.3 | 25 | 25.5 | 9 | 9.2 | 98 | 100.0 |
| OR(95% CI) | | 1.00 | | 2.620(0.350~6.631) | | 1.954(1.001~3.813) | | | |

表 3 RPL 组和对照组 CYP1B1 L432V 多态性等位基因频率分布比较

| 组别 | 人数 | C(亮氨酸) | | G(缬氨酸) | |
|------------|-----|--------|------|--------------------|------|
| | | n | % | n | % |
| RPL 组 | 162 | 103 | 63.6 | 59 | 36.4 |
| 对照组 | 196 | 153 | 78.1 | 43 | 21.9 |
| OR(95% CI) | | 1.00 | | 2.038(1.279~3.247) | |

注: $\chi^2 = 9.129$ $P = 0.003$ 。

3 讨论

CYP1A1 是一类主要代谢多环芳烃类化学致癌物的 I 相代谢酶,具有芳香烃羟化酶活性。CYP1A1 MspI 多态性具有 3 种基因型: A 基因型(m1/m1)、B 基因型(m1/m2)和 C 基因型(m2/m2)^[7]。CYP1B1 对多种外来物质如环境有毒物质、饮食中某些物质具有代谢作用,同时还参与一些起重要生理功能内源性物质如雌激素代谢,在生物体中起重要作用。CYP1B1 基因第 3 外显子上第 432 密码子多态位点可发生编码亮氨酸(Leu)密码子 CTG 被缬氨酸(Val)密码子 GTG 取代(即胞嘧啶被鸟嘌呤取代,C-G 突变)这一改变可能影响蛋白酶活性,从而使体内对环境有害物质及雌激素代谢发生改变,并可能最终影响多种疾病发生和发展^[8]。

近年来 研究报道 CYP 家族基因多态性与生殖状态有关 美国吸烟女性 CYP1A1 基因多态性与新生儿低出生体重有关^[9]。Saijo 等^[10]在日本札幌市人群中 113 例 RPL 患者和 203 名对照者进行 CYP1A1、CYP1B1 基因多态性分析,发现 2 组间 CYP1A1、CYP1B1 基因型频率无差异。与本研究结论部分一致 在大同人群中,CYP1A1 纯合及杂合突变基因型 m2/m2、m1/m2 均未增加 RPL 发病风险。而对于 CYP1B1 基因多态性分析 本研究结果显示,CYP1B1 基因密码子 432 纯合突变基因型、杂合基因型分别使 RPL 发生危险性增加 2.620 和 1.954 倍 等位基因 G 使 RPL

发生危险性增加 2.038 倍。斯德哥尔摩 Karypidis 等^[11]研究表明,CYP1B1 Val432Leu 多态性与早期流产相关 突变基因型使早期流产发病风险增加 1.46 倍 且与咖啡饮用有共同相关性。

CYP1B1 突变基因型可能是 RPL 危险因素。但本研究例数较少,因此,将 CYP1B1 L432V 多态性 G/G、G/C 突变作为判别 RPL 高危患者指标,还需更大范围的介入试验证实,基因筛选和适当饮食控制对预防原因不明 RPL 有一定意义的。

参考文献

- [1] Marcinko VM, Marcinko D, Dordević V, et al. Anxiety and depression in pregnant women with previous history of spontaneous abortion[J]. Coll Antropol 2011, 35(1): 225-228.
- [2] Trubicka J, Grabowska-Ktuzszo E, Suchy J, et al. Variant alleles of the CYP1B1 gene are associated with colorectal cancer susceptibility[J]. BMC Cancer 2010, 11(10): 420.
- [3] Zhu ZY, Mu YQ, Fu XM, et al. Association of CYP1B1 gene polymorphisms and the positive expression of estrogen α and estrogen β with endometrial cancer risk[J]. European Journal of Gynaecological Oncology 2011, 32(2): 188-191.
- [4] 白图雅, 常福厚, 王敏杰, 等. GSTT1 及 CYP1A1 基因多态性与肺癌易感性关系[J]. 中国公共卫生 2011, 27(6): 723-725.
- [5] Shaik AP, Jamil K, Das P. CYP1A1 polymorphisms and risk of prostate cancer: a meta-analysis[J]. Urol J 2009, 6(2): 78-86.
- [6] Tanaka Y, Sasaki M, Kaneuchi M, et al. Polymorphisms of the CYP1B1 gene have higher risk for prostate cancer[J]. Biochem Biophys Res Commun 2002, 296(4): 820-826.
- [7] Esinler I, Aktas D, Alikasifoglu M, et al. CYP1A1 gene polymorphism and risk of endometrial hyperplasia and endometrial carcinoma[J]. Int J Gynecol Cancer 2006, 16(3): 1407-1411.
- [8] Tsuchiya Y, Nakajima M, Yokoi T. Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human[J]. Cancer Lett, 2005, 227(2): 115-124.
- [9] Wang X, Zuckerman B, Pearson C, et al. Maternal cigarette smoking, metabolic gene polymorphism and infant birth weight[J]. JAMA 2002, 287(2): 195-202.
- [10] Saijo Y, Sata F, Yamada H, et al. Ah receptor, CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 gene polymorphisms are not involved in the risk of recurrent pregnancy loss[J]. Mol Hum Reprod 2004, 10(10): 729-733.
- [11] Karypidis AH, Söderström T, Nordmark A, et al. Association of cytochrome P450 1B1 polymorphism with first-trimester miscarriage[J]. Fertil Steril 2006, 86(5): 1498-1503.