·临床研究·

细胞色素 *P4501A1* 基因 *MspI* 多态性对贵州省尿道下裂患儿的易感性*

朱德才[1]，王鹏飞[2,3]，贺享军[1]，熊 杰[1]，龚 亚[1]，孙金惠[1]，陈友兰[1]，田 源[3]，肖跃海[3]，孙 发[3**]，唐开发[3**]

(1. 毕节市第一人民医院 泌尿外科，贵州 毕节 551700；2. 贵州医科大学附院，贵州 贵阳 550004；3. 贵州医科大学第二附属医院 泌尿外科，贵州 凯里 556099)

[摘 要] **目的**：研究细胞色素 *P450*(*CYP*)1A1 基因 *MspI* 多态性对尿道下裂患儿的易感性。**方法**：选取贵州籍单纯性尿道下裂患儿(尿道下裂组)和正常健康儿童(对照组)各 38 例，采用聚合酶链式反应(PCR)和限制内切酶(RFLP-PCR)技术检测两组被检儿童静脉血白细胞基因组 DNA 中 *CYP*1A1 *MspI* 基因多态性，*CYP*1A1 *MspI* 中等位基因分布频率及 Hardy-Weinberg 定律检验，分析两组被检者等位基因频数及 *CYP*1A1 基因 *MspI* 多态性位点基因型频数。**结果**：*CYP*1A1 *MspI* PCR 产物经酶切后可见 340、200 和 140 bp 3 种片段；*CYP*1A1 *MspI* 中等位基因分布频率及 Hardy-Weinberg 定律检验显示，两组儿童静脉血中，尿道下裂组与对照组 m_1、m_2 两等位基因分布频率，以及 m_1m_1、m_1m_2、m_2m_2 这 3 种基因型频数比较，差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论**：*CYP*1A1 *MspI* 基因 m_1、m_2 等位基因分布频率及 m_1m_1、m_1m_2、m_2m_2 这 3 种基因型与尿道下裂发生可能无相关性。

[关键词] 尿道下裂；细胞色素 P450；基因多态性；聚合酶链式反应；限制性内切酶技术

[中图分类号] R726.953 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2017)03-0318-04

DOI：10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.03.016

Susceptibility of Cytochrome *P4501A1* Gene Msp I Polymorphism on Hypospadias Children in Guizhou

ZHU Decai[1], WANG Pengfei[2,3], HE Xiangjun[1], XIONG Jie[1], GONG Ya[1], SUN Jinhui[1], CHEN Youlan[1], TIAN Yuan[3], XIAO Yuehai[3], SUN Fa[3], TNANG Kaifa[3]

(*1. Department of Urology, the First People's Hospital of Bijie, Bijie 551700 Guizhou, China; 2. Department of Urology, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Department of Urology, the Second Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Kaili 556099, Guizhou, China*)

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the susceptibility of *CYP*1*A*1 gene *MspI* polymorphism on hypospadias children. **Methods**: 38 sporadic patients (hypospadias group) and 38 normal healthy children (control group) of Guizhou origin were selected as research subject. Using the polymerase chain reaction (PCR) and restriction endonuclease (RFLP-PCR) technique to detect *CYP*1*A*1 *MspI* gene polymorphism in venous blood leukocytes DNA, alleles distribution frequency in *CYP*1*A*1 *MspI* and Hardy-Weinberg test. Analyzing alleles frequencies and *CYP*1*A*1 gene *MspI* polymorphism genotype frequencies of both groups. **Results**: The products of *CYP*1*A*1 *MspI* were divided into 340, 200 and 140 BP fragments after enzyme digestion. *CYP*1*A*1 *MspI* alleles distribution frequencies and Hardy-Weinberg test indicated that m_1 and m_2, as well as 3 genotype frequencies of m_1m_1, m_1m_2 and m_2m_2 in hypospadias group and control group showed no statistical significant($P>0.05$). **Conclusion**: The distribu-

*[基金项目]国家自然科学基金(81360097,81660263)；贵州省毕节市科技局项目(2012－41－2)

**通信作者 E-mail：doc.tangkf@hotmail.com；sfguizhou@163.com

网络出版时间：2017－3－18 网络出版地址：http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170318.2320.021.html

tion frequencies of *CYP*1*A*1 gene *MspI* and m_1m_1, m_1m_2, m_2m_2 might not share correlation with susceptible factors for hypospadias.

[**Key words**] hypospadias; cytochrome P450; polymorphism; polymerase chain reaction; restriction enzyme technology

尿道下裂是一种因前尿道发育不良而致尿道外口无法达到正常位置的先天性畸形,在男性患儿中常合并阴茎下弯。依据原始尿道外口位置,尿道下裂分为阴茎头型、冠状沟型、阴茎体型和阴囊会阴型[1]。2001 – 2011 年欧洲新生儿尿道下裂发生率为 18.6/万人[2],既往研究表明我国男性新生儿尿道下裂发病率为 5.30/万人,城镇发病率高于农村,沿海发病率高于内地及偏远地区[3]。尿道下裂发病原因及机制至今仍未完全明确,但普遍认为是与内分泌、环境及多基因等因素有关[4-6]。细胞色素 P450 (cyzochrome P450,CYP)是外源性化学物质在体内生物转化第一时相最主要的代谢酶,具有芳香烃羟基化活性酶(AHH)活性。芳烃羟化酶(AHH),属于机体 I 相解毒酶系统,具有广泛的解毒功能。目前,我省人群中 *CYP*1*A*1 基因 *MspI* 多态性与尿道下裂易感性之间的关系暂无相关研究,本研究就此内容进行相关实验。

1　材料与方法

1.1　研究对象

选取2015 年1 月 ~2016 年1 月收治的单纯性尿道下裂患儿 38 例为尿道下裂组,年龄 < 14 岁,排除其他先天性畸形等疾病,且母亲妊娠期间一直居住在贵州省境内原住地;对照组研究对象筛选原则为与尿道下裂组患儿年龄相当的健康儿童 38 例,母亲妊娠期间一直居住原住地。所选研究对象经医院伦理委员会批准,告知研究对象家属实验过程并取得同意。

1.2　主要试剂及仪器

上游引物 5'-CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT-3',下游 5'-TAGGAGTCTTGTCTCATGCCT-3' 由生工生物工程(上海)股份有限公司提供;Ezup 柱式血液基因组 DNA 抽提试剂盒及 2 × EasyTaqPCR SuperMix 为生工生物工程(上海)股份有限公司产品,CYP1A1MspI 限制性内切酶反应体系(50μL 反应体系)由 NEW ENGLAND BioLabs 公司提供,EB 核酸染色剂(美国,Biotium 公司)。高速冷冻离心机(Bec*km*an 公司,德国)、核酸蛋白测定仪(Thermo Fisher Scientific 公司)、PCR 仪(Thermo Fisher Scientific 公司)、电泳仪(北京市六一仪器厂产品)、生物电泳图像分析系统(BIO-RAD 公司)。

1.3　血液标本 DNA 提取

使用普通管生化管(非抗凝管)采集尿道下裂组及对照组儿童外周静脉血 4 mL, 5 000 r/min 离心 1 min;提取血凝块 0.2 g,移至 1.5 mLEP 管,封存并进行编号,放置 – 80 ℃冰箱中保存备用,并按 Ezup 柱式血液基因组 DNA 抽提试剂盒进行操作并对全 DNA 进行检测,提取全 DNA 置于 – 80 ℃冰箱备用。

1.4　*CYP*1*A*1 *MspI* PCR 产物的制备

分别取 2 μL 两组被检儿童全 DNA 样品,放入 200 μLPCR 薄壁管中,依次加入 *CYP*1*A*1 *MspI* 上游引物及下游引物 1 μL;再加入 Taq 酶(2 × Easy Taq® PCR SuperMix)25 μL,然后加入双蒸水(ddH2O)21 μL,使总反应体系为 50 μL。设置 PCR 参数,94 ℃ 4 min,变性温度 94 ℃ 30 s,退火温度 64 ℃ 30 s,延长温度 72 ℃ 30 s,35 个循环,72 ℃ 7 min,产物片段为 340 bp。

1.5　*CYP*1*A*1 *MspI PCR* 产物酶切

取尿道下裂组及对照组 PCR 扩增产物1 μL放入200 μL薄壁管中,加入限制性内切酶 MspI 1 μL(10 U),然后依次加入 10 × CutSmart buffer 5 μL及 ddH_2O 34 μL,使总反应体系体积为50 μL。复混匀,掌上离心机离心 1 min,放入 37 ℃温浴箱 60 min;酶切产物经 2% 琼脂糖凝胶、电压 110 V、时间50 min 电泳后,于凝胶成像分析系统上透视并观察结果。*CYP*1*A*1 *MspI PCR* 酶切产物在凝胶上分为 3 种基因型:无 *MspI* 酶切位点的基因型为 m_1m_1(野生型),可见 1 个 340 bp 片段;存在 *MspI* 酶切位点的等位基因型为 m_2m_2(突变型),见 140 和200 bp 2 个片段;杂合子基因型 m_1m_2,可见 140、200 和 340 bp3 个片段。

1.6　统计学处理

使用 SPSS 13.0 软件统计学分析,对两组被检儿童基因型分布分析行 χ^2 检验。

2　结果

2.1　DNA 完整性及 *CYP*1A1 *MspI* 基因多态性

图 2－1 示视野内电泳条带未见杂带，提示提取的 DNA 完整。图 1 中 340 bp 片段为 PCR 产物 *CYP*1A1 *MspI* 基因，凝胶视野内无杂带出现，提示 PCR 循环条件可行。

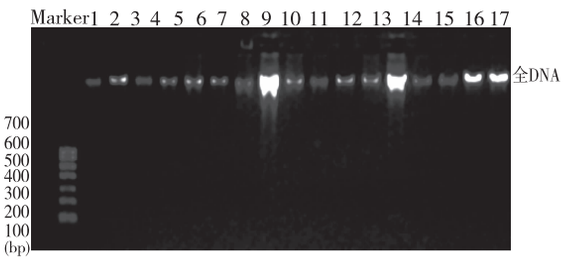


图 1　提取的 DNA 完整性检测

Fig. 1　Full DNA integrity detection

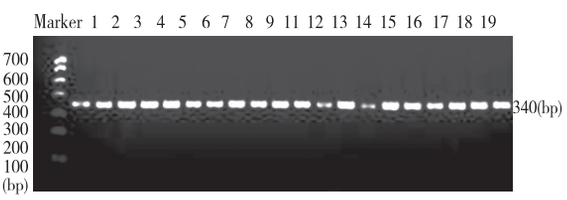


图 2　*CYP*1A1 *MspI* 电泳

Fig. 2　*CYP*1A1 *MspI* PCR Product electrophoresis

2.2　*CYP*1A1 *MspI* PCR 产物酶切后产物

*CYP*1A1 *MspI* PCR 产物经酶切后可见 340、200 和 140 bp 3 种片段（图 3）。

2.3　*CYP*1A1 *MspI* 中 m1、m2、m_1m_1、m_1m_2、m_2m_2 等位基因分布频率

Hardy-Weinberger 检测结果示，尿道下裂组及对照组群体基因遗传平衡，来自同一孟德尔群体（表 1），尿道下裂组及对照组中的 m_1、m_2、m_1m_1、m_1m_2、m_2m_2 等位基因频率比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）（表 2 和表 3）。

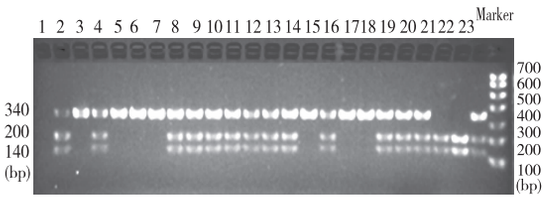


图 3　*CYP*1A1 *MspI* PCR 产物酶切后产物

Fig. 3　Electrophoresis image of product after enzyme digestion

表 1　尿道下裂组和对照组 Hardy-Weinberg 定律检验

Tab. 1　Hardy-Weinberg's test of hypospadias group and normal control group

基因型	尿道下裂组			对照组		
	基因频率	频数 实际	频数 预计	基因频率	频数 实际	频数 预计
m_1m_1	36.84%	14	12.74	39.47%	15	15.16
m_1m_2	42.10%	16	18.53	47.37%	18	17.68
m_2m_2	21.05%	8	6.74	13.16%	5	5.16
χ^2	0.706 6			0.012 1		
P	0.400 0			0.912 3		

表 2　尿道下裂组及对照组 m_1、m_2 等位基因频数

Tab. 2　Comparison of hypospadias group and control group m_1, m_2 allele frequencies

组别	等位基因频数 m_1	等位基因频数 m_2	合计	χ^2	P
尿道下裂组	44(57.9%)	32(42.1%)	76		
对照组	48(63.2%)	28(36.8%)	76	0.441	0.507
合计	92(60.5%)	60(39.5%)	152		

表 3　尿道下裂组与对照组 *CYP*1A1 基因 MspI 多态性位点基因型频数

Tab. 3　Comparison of hypospadias group and normal control group CYP1A1 gene Msp I polymorphism genotype frequency

组别	基因型 m_1m_1	基因型 m_1m_2	基因型 m_2m_2	合计	χ^2	P
尿道下裂组	14(36.8%)	16(42.1%)	8(21.1%)	38		
对照组	15(39.5%)	18(47.4%)	5(13.1%)	38	0.844	0.656
合计	29(38.2%)	34(44.7%)	13(17.1%)	76		

3　讨论

尿道下裂是临床中最常见的男性泌尿生殖系统先天性畸形，尿道下裂患儿母亲妊娠第 6 周时，尿生殖窦腹侧逐渐隆起，并导致尿生殖脊的形成，随后其两端逐步融合，最终形成生殖结节；该结节的两侧隆起为尿道襞，胚胎 7～9 周时，在胚胎内雄

性激素的诱导下，来源于内胚层的尿生殖窦被尿道襞引导，沿腹侧中线由背侧向腹侧逐渐延伸，从后向前依次融合，最终形成完整尿道。在融合过程中，如某种原因干扰，致融合障碍，可导致尿道下裂的发生，进而发生不同程度的尿道下裂，常合并阴茎下弯。依据原始尿道外口位置，可将尿道下裂分为 4 型：(**1**)阴茎头型(含冠状沟型)，尿道外口开口于阴茎冠状沟腹侧，多呈裂隙状，伴轻度阴茎下弯；(**2**)阴茎体型，尿道外口开口于自冠状沟到阴囊阴茎交接处之间的阴茎腹侧，常伴有阴茎下弯；(**3**)阴囊型，尿道外口开口于阴囊部，伴阴囊分裂，明显的阴茎下弯；(**4**)会阴型，尿道外口开口于会阴部，伴阴囊分裂，阴茎发育不全，阴茎短小而弯曲[1]。尿道下裂发病的具体原因，目前仍不明确，但目前认为该疾病主要由环境如母亲妊娠期间孕酮的使用、内分泌、染色体异常及基因异常如雄激素受体基因(AR)、性别决定基因(SRY)、5α-还原酶基因、抗苗勒管激素基因异常或表达异常、雌激素受体(ER)基因突变等存在易感因素[4-6]。(**1**)内分泌因素，文献报道 HCG 刺激尿道下裂患者后，尿道下裂患者与正常对照组相比，其雄激素反映水平低于后者，提示尿道下裂患者的下丘脑－垂体－性腺轴异常；内分泌干扰因子 (endocrine-disruptors, EDs)如残留农药、食品添加剂、化工产品及其副产物，这类物质通过抗雄激素作用、拟雌激素作用、改变生殖细胞凋亡和增殖活性、与芳香烃(arylhydrocarbon, AH)受体拮抗作用导致胎儿尿道下裂的发生[8]；(**2**)染色体异常，有研究提示尿道下裂患者与正常人群相比，尿道下裂患者常染色体或性染色体畸变率明显高于后者[9]；(**3**)环境因素，文献报道暴露于孕酮的母鼠所产后代的尿道下裂发生率较高[10]；前期研究表明动物实验表明氟通过多种途径包括生殖内分泌激素水平、氧化应激水平、睾丸超微结构及 RNA 水平对雄性生殖功能的产生影响，尤其对大鼠血清睾酮水平及生殖内分泌下丘脑－垂体－性腺轴有明显的影响，相关研究表明下丘脑－垂体－性腺轴异常可能与尿道下裂有关[11]；(**4**)基因突变，有学者认为尿道下裂可能与性别分化相关基因突变有关，关于两者的关系有很多报道，如 *ER*、*AR*、*SRY*、5α-还原酶以及抗苗勒管激素等基因[5, 12]。

CYP 分为 CYPlA 和 CYPlB 两种亚型，其中 CYP1A 分为 CYPlAl 和 CYPlA2。CYPlAl 主要表达于肝外组织，除具有芳香烃羟基化活性酶(AHH)活性外，也是睾酮合成过程中限速酶。*CYP*1*A*1 3’端 MspI 位点多态性是 *CYP*1*A*1 基因 Poly A 下游第 264 个碱基 T 碱基换为 C 所致，形成 *MspI* 酶切位点；既往研究发现 *CYP*1*A*1 基因 3’端非编码 *MspI* 多态位点突变基因型 m_2m_2 的酶活性和诱导性较野生型 m_1m_1 及杂合子基因型 m_1m_2 显著增高，尤其是 m_2m_2 型的氧化活性更高，其与多与肿瘤如肺癌、食管癌、肾癌等相关[7,13-14]。AHH 属于机体 I 相解毒酶系统，具有广泛的解毒功能，通过催化多种外源性化学物质、亲电子物质、致癌物质、毒物(或其代谢中间体)及氧化物质从而达到解毒目的。研究表明日本籍尿道下裂母体的 *CYP*1*A*1 基因 MspI 多态性研究发现，母体突变型(m_2m_2)基因型与韩国人、蒙古人及汉族人有明显差异，并认为母体 *CYP*1*A*1 基因 MspI 多态性突变基因可降低尿道下裂发生率[15]；然而，Shekharyadav 等[16]在对印度尿道下裂患儿的 *CYP*1*A*1 基因 MspI 多态性研究时发现，*CYP*1*A*1 基因 MspI 多态性突变基因与尿道下裂的发生无关。本研究通过对贵州籍尿道下裂患儿研究发现，m1、m2 基因频率分布在尿道下裂组和正常健康对照中基因型频率无统计学差异，同时，杂合突变基因型(m_1m_2)、突变纯合子(m_2m_2)突变基因型频率分布同样在两组间中无明确差异，表明贵州省尿道下裂发生和 *CYP*1*A*1 基因多态性可能无关，但 *CYP*1*A*1 基因 MspI 表达产物活性强弱及数量是否与尿道下裂有关，以及在外环境内分泌干扰物质影响下是否对尿道下裂的发生存在相关性，有待进一步研究。

4　参考文献

[1] Barcat, Stephan JC. Clinical and therapeutic study. Apropos of 140 new cases [J]. In Journal de Chirurgie, 1961 (10):551－580.

[2] Bergman JE, Loane M, Vrijheid M, et al. Epidemiology of hypospadias in Europe: a registry－based study [J]. World J Urol, 2015 (12):2159－2167.

[3] 吴艳乔，代礼，王艳萍，等. 中国儿童尿道下裂发生率的变化趋势[J]. 四川大学学报(医学版)，2005 (2)：274－276.

[4] 宋益挺，唐开发，孙平，等. ERα 基因外显子 1 编码子 10 SNP 与尿道下裂及隐睾相关性分析[J]. 中国男科学杂志，2010 (3):12－16.

(下转第 331 页)

[6] Choi BH, Cheong H, Ahn JS, et al. Engineered mussel bioglue as a functional osteoinductive binder for grafting of bone substitute particles to accelerate in vivo bone regeneration[J]. Journal Of Materials Chemistry, 2015(4): 546 - 555.

[7] Liu XY, ChuPK, DingCX. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications[J]. Mater Sci Eng, 2004(3 - 4):49.

[8] Liu L, Song LN, Yang GL, et al. Fabrication, characterization, and biological assessment of multilayer DNA coatings on sandblasted - dual acid etched titanium surface [J]. J Biomed Mater Res A, 2011(3):300 - 310.

[9] Wang Y, Wen C, Hodgson P, et al. Biocompatibility of TiO_2 nanotubes with different topographies[J]. J Biomed Mater Res A, 2014(3):743 - 751.

[10] Gu YX, Du J, Si MS, et al. The roles of PI3K/Akt signaling pathway in regulating MC3T3-E1 preosteoblast proliferation and differentiation on SLA and SLActive titanium surfaces[J]. J Biomed Mater Res A, 2013(3):748 - 754.

[11] Minagar S, Wang J, Berndt CC, et al. Cell response of anodized nanotubes on titanium and titanium alloys[J]. J Biomed Mater Res A, 2013(9):2726 - 2739.

[12] 周屹立,丁仲娟,唐玲. 钛片表面粗糙度和氧化膜对成骨细胞增殖和分化的影响[J]. 上海口腔医学,2013(3):282 - 286.

[13] Minagar S, Wang J, Berndt CC, et al. Cell response of anodized nanotubes on titanium and titanium alloys[J]. J Biomed Mater Res A, 2013(9):2726 - 2739.

[14] Thirugnanam A, Kumar TSS, Uday C. Tailoring the bioactivity of commercially puretitanium by grain refinement using groove pressing [J]. Mater Sci C, 2010(30):203 - 208.

[15] Deligianni DD, Katsala N, Ladas S, et al. Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti6A14 V on human bone marrow cell response and on protein adsorption[J]. Biomaterial, 2001(22):1241 - l251.

[16] Liu X, Zhao X, Li B, et al. Ultra - violet iradiation generate bioactive nano - TiO2 surface[J]. Applied Physics Letters, 2008(4):544 - 552.

(2016-12-22 收稿,2017-02-27 修回)
中文编辑: 周　凌; 英文编辑: 赵　毅

(上接第 321 页)

[5] Tang KF, Zheng JZ, Xing JP. Molecular analysis of SNP12 in estrogen receptor α gene in hypospadiac or cryptorchid patients from northwestern china [J]. Urologia Internationalis, 2011 (3): 359 - 362.

[6] Bouty A, Ayers KL, Pask A. et al. The genetic and environmental factors underlying hypospadias [J]. Sex Dev, 2015 (5):239 - 259.

[7] Palrasu M, Nagini S. Cytochrome P450 structure, function and clinical significance: a review [J]. Curr Drug Targets, 2017(1):17 - 24.

[8] 王瑞芳,董治亚,王伟,等. 52 例尿道下裂患者 5α - 还原酶 2 型基因突变研究[J]. 中国实用儿科杂志, 2012(9):693 - 696.

[9] 唐华建,袁继炎. 尿道下裂与Ⅱ型 3β 羟类固醇脱氢酶基因突变的研究[J]. 临床小儿外科杂志,2002 (4): 282 - 285.

[10] 刘乐,杨屹,王常林. FGFR2 单核苷酸多态性 rs2981582 位点(C/T)与尿道下裂的相关性研究[J]. 中华小儿外科杂志,2011 (3):202 - 205.

[11] Maimoun L, Philibert P, Cammas B. et al. Phenotypical, biological and molecular heterogeneity of 5alpha - reductase deficiency: an extensive international experience of 55 patients [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2011 (2): 296 - 307.

[12] Watanabe M, Yoshida R, Ueoka K, et al. Haplotype analysis of the estrogen receptor 1 gene in male genital and reproductive abnormalities[J]. Hum Reprod, 2007 (5): 1279 - 1284.

[13] Takahashi T, Shimotakahara A, Miyahara K, et al. Activating transcription factor 3 is not up - regulated in hypospadias patients in Japan [J]. Afr J Paediatr Surg, 2013 (4):371 - 373.

[14] Shehata BM, Elmore JM, Bootwala Y, et al. Immunohistochemical characterization of sonic hedgehog and its downstream signaling molecules during human penile development [J]. Fetal Pediatr Pathol, 2011 (4):244 - 251.

[15] Kurahashi N, Sata F, Kasai S, et al. Maternal genetic polymorphisms in CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 and the risk of hypospadias[J]. Mol Hum Reprod, 2005(2):93 - 98.

[16] Shekharyadav C, Bajpai M, Kumar V, et al. Polymorphism in CYP1A1, GSTMI, GSTT1 genes and organochlorine pesticides in the etiology of hypospadias [J]. Hum Exp Toxicol, 2011(10):146414 - 146474.

(2017-01-03 收稿,2017-02-27 修回)
中文编辑: 文箐颖; 英文编辑: 赵　毅