

# 子宫内膜异位症与 TNF- $\beta$ G252A 基因的相关性研究

余鸿标<sup>1</sup>, 姚吉龙<sup>2</sup>

(1. 深圳市罗湖医院 妇科, 深圳 罗湖 518000; 2. 深圳市妇幼保健院 妇科, 深圳 福田 518000)

**[摘要]** 目的: 探讨肿瘤坏死因子(TNF- $\beta$ ) G252A 基因在子宫内膜异位症发病机制中作用。方法: 80 例经腹腔镜和病理确诊的内异症(Ems)患者为 Ems 组, 80 例同期需采用腹腔镜排除子宫内膜异位症的健康妇女为对照组, 取两组妇女静脉血, 采用限制性片段长度多态性聚合酶链反应(PCR-RFLP)技术检测 TNF- $\beta$  G252A 基因的基因频率, 酶联免疫(ELISA)法测定血清 TNF- $\beta$  的含量, 分析子宫内膜异位症与 TNF- $\beta$  G252A 基因之间的关系。结果: Ems 组血清 TNF- $\beta$  的含量明显高于对照组( $P < 0.05$ ), 且 Ems 组血清中 TNF- $\beta$  的含量与 EMT 的分期呈正相关( $r = 0.8532$ ); Ems 组的 A/A 基因型及 G/A 基因型频率均明显高于对照组, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); A/A 基因型患 Ems 的危险度是 G/G 基因型的 3.5 倍。结论: Ems 患者血清中 TNF- $\beta$  的含量与 EMT 的分期呈正相关, A/A 基因型是患 Ems 的危险基因型。

**[关键词]** 子宫内膜异位症; 基因, TNF- $\beta$  G252A; 基因频率; 相关性; 易感性; 新生血管生成

**[中图分类号]** R711.71 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2015)03-0267-03

## The Relationship between Endometriosis and TNF- $\beta$ G252A Gene

YU Hongbiao<sup>1</sup>, YAO Jilong<sup>2</sup>

(1. Department of Gynecology, Luohu hospital of Shenzhen, Shenzhen 518000, Guangdong, China; 2. Department of Gynecology, Maternal and Child Health Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518000, Guangdong, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the role of TNF- $\beta$  G252A gene in pathogenesis of endometriosis (Ems). **Methods:** Eighty Ems patients diagnosed by laparoscopy and histopathologic examination served as Ems group and 80 healthy women served as control group. PCR-RFLP was used to detect gene frequency of TNF- $\beta$  G252A gene, and ELISA was applied to check the serum content of TNF- $\beta$ . The relationship of Ems and TNF- $\beta$  G252A gene was analyzed. **Result:** The serum level of TNF- $\beta$  in Ems group was higher than that in control group ( $P < 0.05$ ), and the serum level of TNF- $\beta$  in Ems group was positively associated with EMT period. A/A and G/A genotypic frequencies in Ems group were significantly higher than those in control group. The risk of Ems of A/A genotype was 3.5 times of G/G genotype. **Conclusions:** The serum level of TNF- $\beta$  in Ems patients is positively associated with EMT period, and A/A genotype is the risk genotype of Ems.

**[Key words]** endometriosis; gene, TNF- $\beta$  G252A; gene frequency; relevance; susceptibility; angiogenesis

子宫内膜异位症(endometriosis, Ems)是一种生育期妇女常见的疾病,指腺体和间质等子宫内膜组织在子宫肌层以外的位置出现生长和浸润,可导致痛经乃至不孕,发生率为10%~15%<sup>[1-2]</sup>。Ems具有明显的家族聚集性,患者的直系亲属患病率是

无家族史患者的6~7倍<sup>[3]</sup>。有研究证实肿瘤坏死因子(TNF)与其它促血管生成因子之间的相互作用能够共同促进新血管生成,而血管的建立和维持是Ems发生、发展的重要环节。肿瘤坏死因子 $\beta$ (TNF- $\beta$ )是体内T细胞产生的淋巴毒素,基因位于

HLA- $\beta$  和 HLA-C2 之间,与 MHC 基因及 TNF- $\alpha$  基因紧密连锁<sup>[4]</sup>。TNF- $\beta$  基因 + 252 位点的等位基因 G/A 位于第 1 启动子,与限制性内切酶的识别密切相关,是 TNF- $\beta$  基因上最主要的多态性位点。本研究通过测定 TNF- $\beta$  基因 + 252 位点的基因多态性和血清中 TNF- $\beta$  的含量,分析 Ems 与 TNF- $\beta$  G252A 基因之间的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 一般资料

2013 年 7 月~2014 年 7 月经腹腔镜和病理确诊的 Ems 患者 80 例作为 Ems 组,根据参考文献[5]进行分期,其中 I~II 期 45 例,III~IV 期 35 例;21~40 岁,平均(30.15 $\pm$ 5.25)岁。需经腹腔镜等手段排除 Ems 的适龄妇女 80 例作为对照组,22~41 岁,平均(30.17 $\pm$ 5.20)岁。全部受试者间均为无血缘关系,饮食结构相似,两组受试者基础资料比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。排除糖尿病疾病、肿瘤、甲状腺肝肾功能不全及严重营养不良并使用过激素治疗的患者。

### 1.2 方法

**1.2.1 TNF- $\beta$  的含量测定<sup>[6]</sup>** 全部受试者均采用腹腔镜在空腹时抽取静脉血 3 mL,3 500 r/min 离心 10 min 后收集上清,分 2~3 管置 -70 $^{\circ}$ C 保存。采用 TNF- $\beta$  酶联免疫试剂盒(购自上海森雄科技实业有限公司)按照说明检测血清中 TNF- $\beta$  含量,每份标本做 2 个副孔。

**1.2.2 TNF- $\beta$  G252A 位点多态性检测<sup>[7]</sup>** 采用酚-氯仿法提取白细胞中的 DNA<sup>[8]</sup>,设计并合成(大连宝生物工程有限公司)PCR 引物<sup>[11]</sup>。TNF- $\beta$  G252A 上游引物为 5'-CCGTGCTTCGTGCTTTTGACTA-3',下游引物为 5'-AGAGCTGCTGGGACATGTCTG-3'。PCR 体系 50  $\mu$ L(含 10 $\times$ 缓冲液 6  $\mu$ L,2 mol/ $\mu$ L 的 dNTP 3  $\mu$ L,上、下游引物浓度 0.4 mol/L,基因组 DNA 0.1  $\mu$ g,Taq DNA 聚合酶 2U)。循环条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 30 s、60 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。结果判定:出现 555 bp、185 bp 两条带为 G 等位基因纯合子(TNF- $\beta$  1/1 型);555 bp、185 bp、740 bp 3 条带为 G/A 杂合子(TNF- $\beta$  1/2 型);仅出现 740 bp 一条带为 A 等位基因纯合子(TNF- $\beta$  2/2 型)。

### 1.3 统计学处理

数据使用 SPSS 13.0 统计软件分析,计量资料

采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,两样本均数比较采用  $t$  检验,计数资料采用率(%)表示,比较采用  $\chi^2$  检验, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 血清 TNF- $\beta$ 含量与 EMT 分期的相关性

Ems 组血清中 TNF- $\beta$  含量明显高于对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ );Ems 组 III、IV 期患者血清 TNF- $\beta$  含量明显高于 I、II 期患者,差异有统计学意义( $P<0.05$ );见表 1。Ems 组血清中 TNF- $\beta$  的含量与 EMT 分期之间正相关( $r=0.853\ 2$ )。

表 1 子宫内位异位症组与对照组  
血清 TNF- $\beta$  含量

Tab. 1 The levels of TNF- $\beta$  in Ems  
group and the control group

组别	<i>n</i>	TNF- $\beta$ 含量( $\mu$ g/L)
对照组	80	0.87 $\pm$ 0.12
Ems 组		
I、II 期	45	1.10 $\pm$ 0.09 <sup>(1)</sup>
III、IV 期	35	1.79 $\pm$ 0.27 <sup>(1)(2)</sup>

<sup>(1)</sup>与对照组比较, $P<0.05$ ;<sup>(2)</sup>与 I、II 期比较, $P<0.05$

### 2.2 TNF- $\beta$ G252A 位点多态性及分布

PCR 扩增结果显示 Ems 组和对照组均检出 TNF- $\beta$  G252A 位点 G/A 突变。TNF- $\beta$  G252A 多态位点不同基因型如图 1 的电泳图谱所示。两组间各基因型分布差异有统计学意义( $P<0.05$ ),A/A 基因型及 G/A 基因型频率在 Ems 组中均高于对照组。而 A/A 基因型患内异症的危险度是 G/G 基因型的 3.5 倍。见表 2。

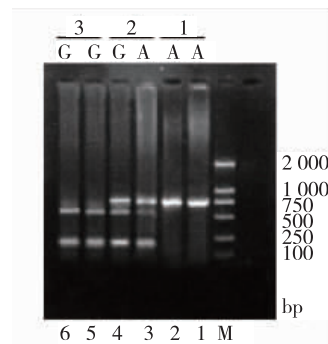


图 1 TNF- $\beta$  G252A 位点扩增  
产物电泳结果

Fig. 1 Electrophoresis results of PCR  
product of TNF- $\beta$  G252 gene

表 2 Ems 组与对照组 TNF-β  
G252A 位点基因型频率  
Tab.2 Comparison of genotypic frequencies  
of TNF-β 252 gene between Ems  
group and control group

组别	n	基因型频率(%)		
		G/G	G/A	A/A
Ems 组	80	8(10)	38(47.5)	34(42.5)
对照组	80	19(23.8)	36(45)	25(31.2)
OR		1	2.3	3.5

3 讨论

Ems 是一类良性肿瘤,但具有能够侵袭转移和复发的特点。对于 TNF 基因与 Ems 之间的关系,学说众多却均无定论。因此,探明其中的关系,对于 Ems 的诊断、治疗及预后方面将有重大意义<sup>[1-2]</sup>。

本研究中,实验组血清中测得 TNF-β 含量显著高于对照组( $P < 0.05$ ),实验组Ⅲ、Ⅳ期明显高于Ⅰ、Ⅱ期( $P < 0.05$ ),实验组血清中 TNF-β 的含量与 EMT 分期之间正相关( $r = 0.853\ 2$ )。这可能是因为 TNF 是重要的血管生成因子,可促进内膜异位灶的血管形成和盆腔粘连<sup>[5]</sup>。在 Ems 早期 TNF-β 可诱导产生多种细胞因子如 IL-1、IL-6 等炎症介质调控并促使种植灶中新生血管的生长、分化,最终形成内异症病灶。过量的 TNF 又可降低机体的免疫状态,使得 Ems 进一步发生、发展。因此,会伴随着 Ems 病情的加重,患者体内血清中 TNF-β 的浓度会逐步增高。

此外,两组间各基因型分布差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),A/A 基因型及 G/A 基因型频率在实验组中均高于对照组。而 A/A 基因型患 Ems 的危险度是 G/G 基因型的 3.5 倍。说明等位基因 A 将使 Ems 的患病概率明显增加,与张良等<sup>[9]</sup>的报道一致,但与车坤兰等<sup>[10]</sup>报告的实验组和对照组间无差异结果不同。主要原因在于单一基因对 Ems 发病的作用,更多的受到了种族、生存环境、饮食习惯等因素的影响,探究多基因同疾病的关系更具借鉴意义。

综上,Ems 患者血清中 TNF-β 的含量与 EMT 的分期呈正相关,A/A 基因型是患 Ems 的危险基因型。但是由于单一基因对 Ems 发病的作用会受到了种族、生存环境、饮食习惯等因素的影响,同时存在研究样本量偏少等问题,需要进一步加大样本量研究。

4 参考文献

[1] 朱琳, 颜士杰, 沙玉成. 血清和腹腔液中 CA125, TNF-α 与子宫内膜异位症患者相关性研究[J]. 中国妇幼保健, 2014(8):1196-1198.

[2] 焦路阳, 郭庆合, 鲁广建. 血清 TNF-α, IL-6 与 IL-8 在子宫内膜异位症中的检测及意义[J]. 现代预防医学, 2012(17):4540-4540.

[3] 陈海霞. TNF-β 基因 A252G 位点多态性及其在血浆和组织中表达与淋巴瘤关系的研究[D]. 新疆医科大学, 2012.

[4] Steff AM, G agne D, Page M, et al. Serum concentrations of insulin-like growth factor- 1, soluble tumor necrosis factor receptor- 1 and angiogenin in endometriosis patients [J]. Am J R eprod Immuno, 2004 (2):166-173.

[5] 吴佩蔚. 子宫内膜异位症不孕患者血清 IL-6 及 TNF-α 水平变化研究[J]. 中国妇幼保健, 2013(10):1644-1646.

[6] 罗敏, 何援利, 彭冬先, 等. 子宫内膜异位症患者血清 TNF-α 和 TNF-β 的测定[J]. 中南大学学报, 2005 (3):304-306.

[7] 陈晓, 王宇学. 实时荧光定量 RT-PCR 法检测 TNF-αmRNA 基因表达[J]. 现代检验医学杂志, 2006(4):13-15.

[8] 宋洁云, 刘芳宏, 马军, 等. 酚/氯仿法和盐析法提取人类外周血基因组 DNA 方法的比较[J]. 中国实验诊断学, 2013(5):802-805.

[9] 张良, 奚庆华, 鞠少卿. 肿瘤坏死因子 β 基因多态性与江苏子宫内膜异位症患者的相关性研究[J]. 医学检验与临床, 2008(6):10.

[10] 车坤兰, 罗程, 何凤仪, 等. 子宫内膜异位症与肿瘤坏死因子 TNFα-308G/A 和 TNFβG252A 基因多态性的关系[J]. 解剖学研究, 2010(1):21-24.

(2015-01-05 收稿,2015-02-22 修回)

中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 周 凌