

雌激素受体- β 基因多态性对广西壮族绝经后妇女 促卵泡激素、黄体生成素和雌孕激素的影响

陈建海, 李海, 杨洁, 梁倩, 方晓燕, 黎飏, 顾建忠

(右江民族医学院, 广西 百色 533000)

摘要:目的 了解雌激素受体(ER)- β 基因型对壮族妇女绝经后其血清促卵泡激素、黄体生成素和雌孕激素的影响,为老年女性雌激素缺乏的疾病的提前防治提供个体化方案。方法 对379例壮族(广西)45~50岁绝经妇女清晨空腹常规采静脉血5 ml,使用PCR-RFLP方法检测并分析ER- β 基因分布情况,用放射免疫试剂盒法测定各基因型样本血清的促卵泡激素、黄体生成素、雌二醇和孕激素。结果 在对5个ER- β 基因 *Rsa* I 酶切基因(RR、Rr、rr、r、R)组的血清促卵泡激素、黄体生成素和雌二醇、孕酮水平比较中发现:RR 基因组、Rr 基因组、rr 基因组、R 基因组,4组间两两比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);而r 基因组与其它4组之间比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),r 基因组的血清雌二醇和孕酮水平明显低于其它4组($P < 0.05$),而r 基因组的促卵泡激素、黄体生成素明显高于其它4组($P < 0.01$)。对5个ER- β 基因 *Alu* I 酶切基因(AA、Aa、aa、a、A)组的血清雌二醇、孕酮水平比较中发现,AA 基因组、Aa 基因组、a 基因组、A 基因组4组间相比较差异无统计学意义($P > 0.05$);aa 基因组与其它4组之间比较差异有统计学意义($P < 0.01$),aa 基因组的血清雌二醇和孕酮水平明显高于其它4组($P < 0.05$),而aa 基因组的促卵泡激素、黄体生成素明显低于其它4组($P < 0.01$)。结论 携带ER- β *Rsa* I 酶切的r 等位基因绝经后妇女雌孕激素水平比较低,更易患绝经后雌激素缺乏性老年性疾病,应做好提前防治。而携带ER- β *Alu* I 酶切基因的aa 等位基因型的绝经后妇女,其雌孕激素水平较高,不易患雌激素缺乏性疾病。

关键词: 壮族; 雌激素受体 β ; 基因多态性; 绝经后期

中图分类号: R392.11

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2018)06-0529-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2018.06.005

Effects of estrogen receptor- β gene polymorphism on follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, and estrogen and progesterone in postmenopausal women of Guangxi Zhuang nationality

Chen Jianhai, Li Hai, Yang Jie, Liang Qian, Fang Xiaoyan, Li Biao, Gu Jianzhong

(Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To understand the effects of estrogen receptor (ER)- β genotype on serum follicle stimulating hormone, luteinizing hormone and estrogen and progesterone in Zhuang women after menopause, and to provide individualized treatment for early prevention and treatment of estrogen deficiency diseases in elderly women. **Methods** Each of 379 Guangxi Zhuang nationality postmenopausal women aged 45 to 50 years was routinely drawn 5ml of venous blood in the morning, and the distribution of ER- β gene was detected and analyzed by PCR-RFLP. The follicle stimulating hormone, luteinizing hormone and estradiol and progesterone in serum samples of each genotype were determined by radioimmunoassay kit. **Results** Comparison of the serum follicle stimulating hormone, luteinizing hormone and estradiol, progesterone levels in the five ER- β restriction enzyme *Rsa* I genomes (RR, Rr, rr, r, R) indicated that pairwise comparison among RR genome, Rr genome, rr genome and R genome yielded no statistically significant difference ($P > 0.05$). Comparison between r genome and the other four groups yielded significant difference ($P < 0.05$), the serum estradiol and progesterone expressions in r genome were significantly lower than those of the other 4 genomes ($P < 0.05$),

基金项目: 国家自然科学基金项目(81760592); 广西科技攻关计划项目(桂科攻 1598012-46); 广西自然科学基金(2013GXNSFAA019241、2010GXNSFA013268); 广西教育厅立项课题(KY2016YB344)

第一作者简介: 陈建海(1976-),男,讲师,研究方向:植物性激素对老年性疾病的防治,E-mail:chen9683@126.com

通信作者简介: 李海(1962-),男,教授,研究方向:植物性激素对老年性疾病的防治,E-mail:lihaiying702@163.com

while the follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in the r genome were significantly higher than those of the other 4 genomes ($P < 0.01$). Comparison of serum estradiol, and progesterone levels in the 5 ER- β gene restriction enzyme *Alu* I genomes (AA, Aa, aa, a, A) indicated that pairwise comparison among AA genome, Aa genome, a genome and A genome yielded no statistically significant difference ($P > 0.05$). Comparison between the aa genome and the other 4 genomes yielded statistically significant difference ($P < 0.01$), the serum estradiol and progesterone levels in the aa genome were significantly higher than those of the other 4 genomes ($P < 0.05$), while follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in aa genome were significantly lower than those of the other 4 genomes ($P < 0.01$). **Conclusion** The ER- β restriction enzyme *Rsa* I r allele carriers in postmenopausal women have a lower level of estrogen and progesterone, which is more prone to have senile postmenopausal estrogen deficiency diseases so that prevention and treatment should be done in advance. The ER- β restriction enzyme *Alu* I aa allele carriers in menopausal women have higher levels of estrogen and progesterone and are less prone to have estrogen deficiency disease.

Key words: Zhuang nationality; estrogen receptor- β ; gene polymorphism; postmenopause

据相关部门统计,我国2017年60岁以上已经达到总人口17.35%,而且老年化还在加剧。绝经后女性由于卵巢萎缩,其分泌女性相关激素明显下降,雌孕激素缺乏引起很多女性老年性疾病^[1-3],比如绝经后骨质疏松症、阿尔茨海默病等,临床治疗效果不佳,临床症状还会日益加重,给家庭、社会带来越来越严重负担。雌激素可以用来防治女性老年性疾病已经被许多研究所证实,但雌激素的生理效应不仅取决于雌激素的量,还受雌激素受体敏感性的影响。而雌激素受体基因多态性与遗传有关^[4-5],通过检测广西壮族绝经妇女ER- β 基因多态性与血清雌孕激素水平之间关系,找出引起雌孕激素水平降低的雌激素受体基因人群,提前对这些易患老年疾病人群进行防治,会大大提高防治效果,减少此类疾病防治成本,这个研究成果能够推广使用既有较好经济效益,也有较好社会效益。

1 材料和方法

1.1 研究对象 45~50岁广西百色山区偏僻村寨祖辈3代以上父母双亲均为壮族绝经妇女379例,没有内脏器官(心、肝、肺、肾和脾等)疾病,没有内分泌疾病和妇产科疾患,也没有服用雌激素类药物,以雌激素受体- β 的*Rsa* I酶切和*Alu* I酶切所得等位基因型:RR、Rr、rr、r、R和AA、Aa、aa、a、A进行分组。

1.2 女性激素的检测 血样本通过1-16PK离心机进行离心(4000 r/min),分离出血清样本,放在低温冰箱,-20℃条件保存待用。美国BECKMAN COULTER生产化学免疫分析仪,用化学发光免疫法,对每个基因型样本血清孕酮(P)、血清雌二醇(E₂)、黄体生成素(LH)和促卵泡激素(FSH)含量测定。

1.3 ER基因多态性检测

1.3.1 引物制作 参照文献合成^[3],ER- β 基因的扩增*Rsa* I位点为:上游的引物是:5'-TCTTGCTTTC-CCCAGGCTTT-3',下游的引物是:5'-ACCTGTC-CAGAACAAGATCT-3'。ER- β 基因的扩增*Alu*I位点:P1:5'-TTTTTGTCCCATAGTAACA-3', P2:

5'-AATGAGGGACCACAGCA-3'。

1.3.2 提取 样本DNA模板:碘化钠法(改良)。取量为100 μ l经抗凝样本全血,吸入双蒸水,量为100 μ l,均匀后,注入浓度为6 mol/L NaI,量为200 μ l,震荡均匀30 s,再加同体量的异戊醇/氯仿(1:24)均匀震荡30 s,经离心分出上清液和下沉物,取上清液,加注异丙醇,按1:0.6比例,并进行涡旋均匀混合液,4℃低温置放15 min,再进行离心提取下沉物,沉淀物通过70%酒精洗涤1次后,晾沉淀物至干后,再溶在Tris-HCl+EDTA溶液之中,最后提取DNA样本,放置紫外分光光度计定量测量,放置低温(-20℃)待用。

1.3.3 PCR扩增 反应体系=10 \times Buffer 200 μ mol/L+dNTPs 200 μ mol/L=50 μ l,引物=0.4 μ mol/L,模板=0.1 μ g的模板DNA。反应体+引物+DNA模板放置热循环仪(Bio-Rad型)中,在95℃预变性5 min之后加注3 U的聚合(TaqDNA)。按常规进行循环、变性、退火和延伸。取其10 μ l反应最终产物进行电泳、染色,在紫外灯下验证电泳结果和产物特性。

1.3.4 酶切扩增物 取限制酶*Rsa* I 10 U,20 U *Alu* I限制酶+10 μ l扩增产物一起在37℃温度条件下进行酶切反应3 h。反应后的最终产物在2%琼脂糖电泳凝胶进行电泳,用溴化乙啶进行定时30 min的染色,Marker为DNA分子量的作为参照柱,在紫外灯条件下观察。

1.4 统计学方法 采用SPSS 18.0统计软件对数据进行分析。实验的统计数据以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用计量资料单因素多样本均数比较,两组之间比较采用 q 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ER- β 基因型分析

2.1.1 ER基因多态性 使用*Rsa* I酶切可区分出3种基因型:Rr型(156 bp、125 bp、65 bp大小的3条带);RR型(156 bp、135 bp、125 bp大小的3条带),rr

型(156 bp 大小的 1 条带),见图 1。

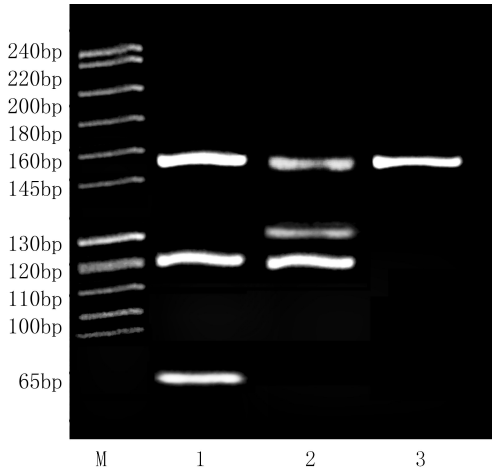


图 1 ER-β 基因 Rsa I 多态性电泳图

注: M: Markers; 1: Rr 基因型; 2: RR 基因型; 3: rr 基因型

2.1.2 ER-β 基因 Alu I 酶切 使用 Alu I 酶进行酶切可以区分出 3 种基因型: aa 型(380 bp 大小的 1 条带), Aa 型(380 bp、236 bp 大小的 2 条带), AA 型(236 bp、150 bp、65 bp 大小的 3 条带),见图 2。

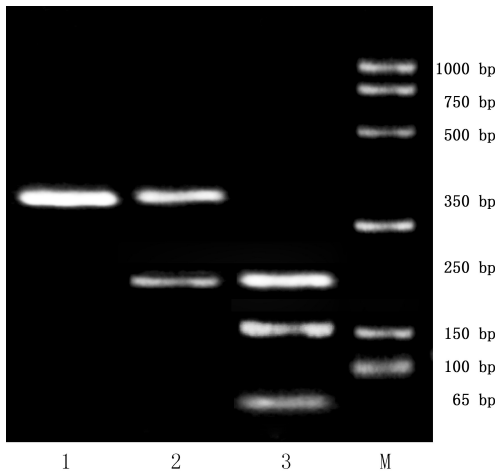


图 2 ER-β 基因 Alu I 酶切多态性电泳图

注: M: Markers; 1: aa 基因型; 2: Aa 基因型; 3: AA 基因型

2.2 ER-β 基因 Rsa I 多态性与促卵泡激素、黄体生成素和雌孕激素测量结果 广西壮族绝经妇女 45~50 岁 5 个 ER-β 基因 Rsa I 酶切基因(RR、Rr、rr、r、R)组的血清雌二醇、孕酮水平中,RR 基因组、Rr 基因组、rr 基因组、R 基因组四组间两两比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$),r 基因组与其它组之间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$):r 基因组的雌二醇和孕酮血液水平明显低于其它四组 ($P < 0.05$),而 r 基因组的促卵泡激素、黄体生成素明显高于其它四组 ($P < 0.01$),见表 1、表 2。

表 1 ER-β 基因 Rsa I 多态性与促卵泡激素、黄体生成素和雌孕激素测量结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FSH (IU/L)	LH (IU/L)	E ₂ (ng/L)	P (μg/L)
RR(1)	70	4.87±0.64	5.02±0.81	16.33±4.05	16.13±3.02
Rr(2)	76	5.12±1.02	4.99±1.02	17.09±4.80	14.94±3.72
rr(3)	83	4.84±0.86	5.16±0.83	15.82±3.60	15.53±3.11
r(4)	68	7.98±0.79	8.32±0.78	11.42±4.20	12.52±4.82
R(5)	82	4.94±0.78	5.10±0.93	16.40±5.12	14.78±3.67
F 值		243.76	204.78	18.72	9.57
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:项目栏内 FSH:促进卵泡激素;LH:黄体生成素;E₂:雌二醇;P:孕酮

表 2 5 个样本均数两两比较的 q 检验结果

组别	FSH(IU/L)		LH(IU/L)		E ₂ (ng/L)		P(μg/L)	
	q 值	P 值	q 值	P 值	q 值	P 值	q 值	P 值
第 1 与第 2	2.57	>0.05	1.45	>0.05	1.48	>0.05	2.75	>0.05
第 1 与第 3	0.31	>0.05	1.38	>0.05	1.01	>0.05	1.41	>0.05
第 1 与第 4	31.09	<0.01	31.09	<0.01	9.28	<0.01	8.11	<0.01
第 1 与第 5	3.23	>0.05	2.27	>0.05	0.14	>0.05	3.17	>0.05
第 2 与第 3	3.00	>0.05	2.93	>0.05	2.57	>0.05	1.42	>0.05
第 2 与第 4	29.17	<0.01	33.16	<0.01	10.93	<0.01	5.55	<0.01
第 2 与第 5	3.62	>0.05	0.81	>0.05	1.39	>0.05	0.38	>0.05
第 3 与第 4	32.68	<0.01	30.99	<0.01	8.65	<0.01	7.04	<0.01
第 3 与第 5	2.84	>0.05	2.81	>0.05	1.2	>0.05	1.84	>0.05
第 4 与第 5	41.94	<0.01	34.53	<0.01	9.77	<0.01	5.27	<0.01

注:项目栏内 FSH:促进卵泡激素;LH:黄体生成素;E₂:雌二醇;P:孕酮

2.3 ER-β 基因 Alu I 多态性与促卵泡激素、黄体生成素和雌孕激素测量结果 广西壮族绝经妇女 45~50 岁 5 个 ER-β 基因 Alu I 酶切基因(AA、Aa、aa、a、A)组的血清雌二醇、孕酮水平中,AA 基因组、Aa 基因组、a 基因组、A 基因组,四组间两两比较,差异无显著性 ($P > 0.05$),aa 基因组与其它 4 组之间比较差异有显著性 ($P < 0.05$):aa 基因组的雌二醇和孕酮血液水平明显高于其它 4 组 ($P < 0.05$),而 aa 基因组的促卵泡激素、黄体生成素明显低于其它 4 组 ($P < 0.01$),见表 3、表 4。

表 3 ER-β 基因 Alu I 多态性与促卵泡激素、黄体生成素和雌孕激素测量结果 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FSH (IU/L)	LH (IU/L)	E ₂ (ng/L)	P (μg/L)
AA(1)	70	5.07±0.84	4.92±0.80	16.23±4.00	16.03±3.42
Aa(2)	76	5.22±1.00	4.88±0.82	17.20±4.90	14.96±3.75
aa(3)	83	2.58±0.72	2.16±0.78	22.25±4.03	18.80±4.22
a(4)	68	4.84±0.84	4.86±0.83	15.72±3.63	15.23±3.13
A(5)	82	4.82±0.98	4.89±0.95	16.10±5.10	14.68±3.68
F 值		115.37	171.03	30.57	16.88
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:项目栏内 FSH:促进卵泡激素;LH:黄体生成素;E₂:雌二醇;P:孕酮

表4 5个样本均数两两比较的 q 检验结果

组别	FSH(IU/L)		LH(IU/L)		E ₂ (ng/L)		P(μ g/L)	
	q 值	P 值	q 值	P 值	q 值	P 值	q 值	P 值
第1与第2	1.45	>0.05	0.41	>0.05	1.88	>0.05	2.48	>0.05
第1与第3	24.59	<0.01	28.64	<0.01	11.94	<0.01	6.55	<0.01
第1与第4	2.75	>0.05	0.59	>0.05	0.96	>0.05	1.8	>0.05
第1与第5	2.32	>0.05	0.31	>0.05	0.28	>0.05	3.18	>0.05
第2与第3	26.65	<0.01	28.85	<0.01	10.23	<0.01	9.28	<0.01
第2与第4	2.37	>0.05	0.20	>0.05	2.85	>0.05	0.62	>0.05
第2与第5	2.09	>0.05	0.11	>0.05	2.22	>0.05	2.38	>0.05
第3与第4	15.28	<0.01	27.80	<0.01	12.84	<0.01	10.15	<0.01
第3与第5	12.76	<0.01	29.53	<0.01	12.71	<0.01	4.29	<0.05
第4与第5	1.13	>0.05	0.31	>0.05	0.75	>0.05	1.29	>0.05

注:项目栏内FSH:促进卵泡激素;LH:黄体生成素;E₂:雌二醇;P:孕酮

3 讨论

绝经后卵巢功能下降,分泌雌激素和孕激素减少,血清雌孕激素水平下降。很多生理功能跟雌孕激素密切相关,雌孕激素水平下降自然会导致一些生理功能降低。比如雌孕激素下降,引起神经组织氧化损伤,加速神经细胞退化凋亡,最典型的是阿尔茨海默病,表现为不同程度认知障碍。雌激素预防效果较好,但治疗效果较差。当雌激素水平降低,破骨细胞分化成熟,分泌酸和溶骨酶,使骨钙溶解吸收,骨细胞退化凋亡,骨组织疏松,也叫骨质疏松症^[6-7]。但在临床上研究也发现,相同雌激素水平,其雌激素缺乏引起病情轻重,也各不相同,说明雌激素的保护作用,除了与雌激素的量有关以外,还跟雌激素受体的敏感性有关,雌激素受体对雌激素的敏感性可能与雌激素受体基因型有关^[8]。

广西壮族绝经妇女45~50岁5个ER- β 基因Rsa I酶切基因(RR、Rr、rr、r、R)组的血清雌二醇、孕酮水平中,RR基因组、Rr基因组、rr基因组、r基因组、R基因组中,r基因组的雌二醇和孕酮血液水平明显低于其它4组,而r基因组的雌二醇和孕酮血液水平下降,反馈作用于脑垂体,引起垂体分泌更多促卵泡激素、黄体生成素^[9-10],所以r基因组的促卵泡激素、黄体生成素明显高于其它4组。ER- β 基因的Rsa I酶切基因r基因型,在绝经后此类基因型的人群,雌激素水平更低,更易患雌激素缺乏性老年性疾病,患病临床症状更重,此类人群应该提前预防。

广西壮族绝经妇女45-50岁5个ER- β 基因Alu I酶切基因(AA、Aa、aa、a、A)组中,aa基因组与其它4组之间比较差异有显著性,aa基因组的雌二醇和孕酮血液水平明显高于其它4组。而aa基因组的雌二醇和孕酮血液水平升高,反馈作用于脑垂体,引起垂体分泌更多促卵泡激素、黄体生成素分泌减少,所以aa基因组的促卵泡激素、黄体生成素明显低于其它4组。携带ER- β 基因的Alu I酶切基因aa基因型的绝经后

女性雌激素水平较高,不易患雌激素缺乏性老年性疾病^[10-11],即使患上雌激素缺乏性老年疾病,临床症状也相对较轻,治疗效果也较好。

参考文献:

- [1] Dou C,Ding N,Zhao C,et al. Estrogen Deficiency-Mediated M2 Macrophage Osteoclastogenesis Contributes to M1/M2 Ratio Alteration in Ovariectomized Osteoporotic Mice[J]. J Bone Miner Res,2018,33(5):899-908.
- [2] Luo Z,Liu M,Sun L,et al. Icarin recovers the osteogenic differentiation and bone formation of bone marrow stromal cells from a rat model of estrogen deficiency-induced osteoporosis[J]. Mol Med Rep,2015,12(1):382-388.
- [3] Aydin H,Deyneli O,Yavuz D,et al. Effect of oxidative stress on aorta and tibia osteoprotegerin gene expression in ovariectomized rats[J]. Minerva Endocrinol,2011,36(2):107-115.
- [4] Shoukry A,Shalaby SM,Etewa RL,et al. Association of estrogen receptor β and estrogen-related receptor α gene polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal women[J]. Mol Cell Biochem,2015,405(1-2):23-31.
- [5] Deng W,Han JC,Chen L,et al. Estrogen receptor alpha gene PvuII polymorphism and risk of fracture in postmenopausal women: a meta-analysis[J]. Genet Mol Res,2015,14(1):1293-1300.
- [6] Obemayer-Pietsch B,Chararas C,Kotschan S,et al. Genetic background of osteoporosis[J]. Acta Med Austriaca,2000,27(1):18-22.
- [7] Schuit SC,de Jong FH,Stolk L,et al. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms are associated with estradiol levels in postmenopausal women[J]. Eur J Endocrinol,2005,153(2):327-334.
- [8] Tural S,Kara N,Alayli G,et al. Association between osteoporosis and polymorphisms of the bone Gla protein, estrogen receptor 1,collagen 1-A1 and calcitonin receptor genes in Turkish postmenopausal women[J]. Gene,2013,515(1):167-172.
- [9] 李海,陈建海,王金花,等. 山茶籽对未成熟大鼠乳腺和子宫发育的影响[J]. 解剖学杂志,2012,35(5):592-594.
- [10] Lin PI,Tai YT,Chan WP,et al. Estrogen/ER α signaling axis participates in osteoblast maturation via upregulating chromosomal and mitochondrial complex gene expressions[J]. Oncotarget,2017,9(1):1169-1186.
- [11] Luo D,Liu Y,Zhou Y,et al. Association between dietary phytoestrogen intake and bone mineral density varied with estrogen receptor alpha gene polymorphisms in southern Chinese postmenopausal women [J]. Food Funct,2015,6(6):1977-1983.

收稿日期:2018-10-22;修回日期:2018-11-19