

· 论 著 ·

FSH β 基因-211G \rightarrow T 多态性与多囊卵巢综合征的相关性研究

宋倩倩, 杨梦云, 赵学科, 邱慧玲

【摘要】 目的 探讨卵泡刺激素 β 亚基(follicle stimulating hormone β -subunit, FSH β) 基因-211G \rightarrow T(rs10835638) 单核苷酸多态性与多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS) 易感性及临床内分泌代谢特征的关系。**方法** 以 2013 年 3-8 月于解放军 174 医院妇科就诊的 254 例女性(100 例 PCOS 和 154 例对照女性) 为研究对象。收集所有研究对象年龄、身高、体重等资料, 抽取静脉血检测六项生殖激素、空腹血糖、血脂等指标, 采用 PCR 和 DNA 测序方法, 检测 FSH β -211G \rightarrow T 的基因型分布, 并分析其与 PCOS 临床内分泌代谢特征的关联。**结果** FSH β -211G \rightarrow T 的基因型在两组中的分布差异有统计学意义($P < 0.05$)。PCOS 携带 FSH β -211G \rightarrow T GT 基因型的患者较 GG 基因型患者具有低 FSH 水平与高 LH/FSH($P < 0.05$); 对照组中携带 FSH β -211G \rightarrow T GT 基因型的具有高 LH/FSH 比值及高总胆固醇水平($P < 0.05$)。**结论** FSH β -211G \rightarrow T 基因多态性可能是 PCOS 发病的原因之一。

【关键词】 多囊卵巢综合征; 卵泡刺激素 β 亚基基因; 基因多态性

【中图分类号】 R711.75 **【文献标志码】** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2015.03.006

An association between polymorphism of FSH β gene-211G \rightarrow T and polycystic ovary syndrome

SONG Qian-qian, YANG Meng-yun, ZHAO Xue-ke, QIU Hui-ling. Department of Gynecology, 174 Clinical College of Anhui Medical University/174 Hospital of PLA, Xiamen, Fujian 361000, China

【Abstract】 Objective To study the correlation between polymorphism of follicle stimulating hormone β -subunit (FSH β) gene-211G \rightarrow T (rs10835638) and susceptibility and clinical endocrinal characteristics of polycystic ovary syndrome (PCOS). **Methods** This research performed a case-control study. A total of 254 (100 patients with PCOS and 154 controls with tubal factor infertility, matched for age) women were recruited at department of gynecology, 174 hospital of PLA, between March 2013 and August 2013 in the study. Age, body height, weight, reproductive hormone, Fasting blood glucose and fasting serum lipid were obtained. The genotypes of FSH β -211 G \rightarrow T polymorphism were determined for all cases by polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequencing. **Results** The FSH β -211 G \rightarrow T GT genotype frequency in PCOS was significantly higher than that in controls ($P < 0.05$). Within PCOS group, carriers of FSH β -211 G \rightarrow T GT genotype had lower FSH levels and higher LH/FSH ($P < 0.05$). Within control group, carriers of FSH β -211GT genotype had higher LH/FSH and total cholesterol (TC) levels ($P < 0.05$). **Conclusion** Results suggested FSH β -211G \rightarrow T mutation might influence PCOS susceptibility and clinical endocrinal characteristics. FSH β -211G \rightarrow T is the possible cause of PCOS.

【Key words】 polycystic ovary syndrome; follicle stimulating hormone β -subunit gene; gene polymorphism

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)是育龄期妇女常见的异质性内分泌疾病,发病率 5%~10%^[1]。PCOS 临床表现复杂多样,如月经稀发甚至闭经、无排卵、高雄激素血症、胰岛素抵抗等,其并发症也表现各异,不仅 2 型糖尿病、糖耐量受损及代谢综合征的发生率较高^[2-3],而且子宫内膜癌、妊娠及新生儿并发症、心血管病等的发生风险也高于正常人群^[4-6],PCOS 的病因至今尚未阐明。基因多态性研究是近年来学者们研究的热点,多

数学者认为 PCOS 的发病可能与基因调控有关。卵泡刺激素(follicle stimulating hormone, FSH)由 α 和 β 亚基组成, β 亚基具有特异性并使 FSH 具有生物活性,由卵泡刺激素 β 亚基(follicle stimulating hormone β -subunit, FSH β) 基因编码,FSH 对卵泡生长发育及排卵以及雄激素转化为雌激素起到重要的作用。而 PCOS 患者内分泌特征有:雄激素过多、雌激素过多、黄体生成素与卵泡刺激素比值(luteinizing hormone/follicle stimulating hormone, LH/FSH)增大等。因此,FSH β 基因是 PCOS 病因研究的相关因素,但目前尚缺乏 FSH β -211G \rightarrow T 与 PCOS 的相关性研究。本研究特探讨 FSH β -211G \rightarrow T 与 PCOS 的关系如下。

基金项目: 南京军区医学科技创新课题(10MA065);厦门市科技惠民项目(2013Z20134027)

作者单位: 361000 福建厦门,安徽医科大学解放军 174 临床学院(解放军 174 医院)妇科

通讯作者: 邱慧玲, E-mail: chongmznl@163.com

1 对象与方法

1.1 对象 病例组:收集 2013 年 3-8 月就诊于厦门解放军 174 医院妇科的 18~35 岁 PCOS 100 例,均为福建省汉族人,诊断标准参照 2003 年欧洲人类生殖协会和美国生殖医学协会推荐的诊断标准^[7],即:①稀发排卵或无排卵;②雄激素水平升高的临床表现和(或)高雄激素血症;③B 超监测下的卵巢多囊改变,一侧或双侧卵巢中直径 2~9 mm 的卵泡数 ≥ 12 个,和(或)单侧卵巢体积增大 > 10 mL;符合以上 3 条中的 2 条,并排除其他致雄激素水平升高的病因,包括先天性肾上腺皮质增生、分泌雄激素的肿瘤、库欣综合征等,以及其他引起排卵障碍的疾病,如高催乳素血症、垂体或下丘脑性闭经、卵巢早衰、甲状腺功能异常等。对照组:选择同期因输卵管因素(慢性输卵管炎)不孕而就诊的女性 154 例,入选标准为:年龄 18~35 岁、福建省汉族人;月经规律($25\text{ d} < \text{月经周期} < 35\text{ d}$);B 超监测正常排卵;均无慢性疾病;至少 3 个月未服用过激素类药物。本研究经 174 医院伦理委员会批准,获得每位研究对象的知情,并签署知情同意书。

1.2 试剂与仪器 DNA 提取试剂盒(Roche 公司),DNA 聚合酶(北京全式金生物技术有限公司),部分激素检测试剂盒(瑞士 Roche 公司);Unicel DXI 800 化学发光免疫分析仪及配套生殖激素检测试剂(BECKMAN COULTER 公司),Bioer lifepro PCR 扩增仪(北京东方安诺生化科技有限公司),Cavoy 电泳仪(上海京工实业有限公司),ABI3730 测序仪(厦门闽博生物技术有限公司)。

1.3 实验方法 收集入选对象的年龄、血压、腹围、身高、体重、体质指数、月经史及 B 超监测排卵情况。所有入选对象至少 3 个月未服用过激素类药物,均于月经来潮第 2~3 天(闭经者任何时期),禁食 12 h,抽取静脉血,检测血清 FSH、LH、雌二醇(estradiol, E2)、孕激素(progesterone, P)、睾酮(testosterone, T)、泌乳素(prolactin, PRL)、促甲状腺激素(thyroid stimulating hormone, TSH)、空腹胰岛素(fasting insulin, FINS)、空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG),以及空腹总胆固醇(total cholesterol, TC)、三酰甘油(triglycerides, TG)、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein, LDL)、高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)、血清硫酸脱氢表雄酮(dehydroepiandrosterone sulfate, DHEAS)、性激素结合球蛋白(sex hormone-binding globulin, SHBG)。以稳态模型评估-胰岛素抵抗指数^[8](HOMA-IR) = (FPG

$\times \text{FINS}) / 22.5$ 。并于同样条件下各抽取静脉血 5 mL, EDTA 抗凝,于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存。

提取全血 DNA, PCR 总反应体积 20 μL , 上下游引物(11 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL 、DNA 模板 4 μL 、超纯水 9.4 μL 、10 \times Easytaq Buffer 2 μL 、2.5 mM dNTPs 2 μL 、Easytaq DNA Polymerase 0.6 μL ; FSH β -211G \rightarrow T 基因引物序列[英潍捷基(上海)有限公司合成]:上游引物为:5'-GGTAGTGATTATGTTCTCCCTCAC-3', 下游引物为:5'-CCACTTGAAAACGGTAGATGC-3'。PCR 扩增程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 循环 35 次, 72 $^{\circ}\text{C}$ 最后延伸 5 min, 扩增结束后存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 。取 PCR 扩增产物 2 μL , 在琼脂糖凝胶(1.2%)上, 用稳压 100 V, 电泳 15 min, 于凝胶成像分析仪上成像, 进行基因测序, 获得突变位点基因序列, 与已获取的基因序列比对后, 根据测序图进行基因型鉴定。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 计量资料组间比较若符合正态分布采用 t 检验, 不符合正态分布则采用 Mann-Whitney U 检验; 计数资料以例(率)[$n(\%)$]表示, 组间比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCR 扩增及测序结果 PCR 扩增目的基因片段长 811 bp, 于凝胶成像分析仪上成像见图 1。基因测序结果示 FSH β -211G \rightarrow T 基因变异有两个基因型 G/G 及 G/T(图 2)。

2.2 病例组和对照组的 FSH β -211G \rightarrow T 的基因型及等位基因分布 经 Hardy-Weinberg 平衡检验^[9], 两组等位基因分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律。



扩增的目的基因片段取样(编号 1~10)与 Maker(长度 100~1000 bp)比较

图 1 FSH β -211G \rightarrow T 基因 PCR 产物凝胶成像

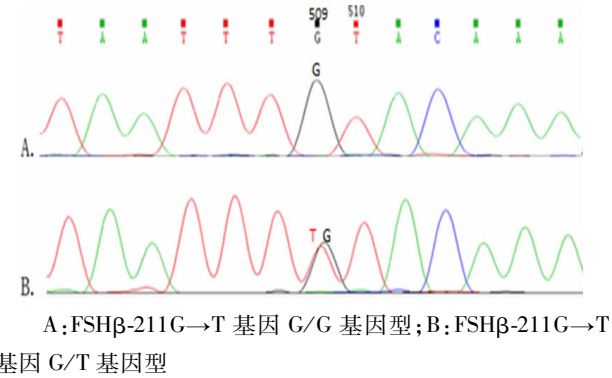


图2 病例组和对照组 FSHβ-211G→T 基因测序结果

在 PCOS 人群中 FSHβ-211G→T 突变 GT 基因型频率为 14.0%, 对照组中 GT 基因型频率为 6.5%, FSHβ-211G→T 的基因型在两组中的分布差异有统计学意义($P<0.05$, 表 1)。

表 1 两组的 FSHβ-211G→T 的基因型及等位基因分布比较		
项目	病例组($n=100$)	对照组($n=154$)
基因型[$n(\%)$]		
GG	86(86.0)	144(93.5)
GT	14(14.0)*	10(6.5)
等位基因(%)		
G	93.0	96.8
T	7.0*	3.2

注:与对照组比较,* $P<0.05$

2.3 不同 FSHβ-211G→T 基因型对病例组及对照组内分泌代谢指标的影响 携带 GT 基因型的患者较 GG 基因型患者具有低 FSH 水平及高 LH/FSH 比值($P<0.05$);同时在对照组中发现具有 GT 基因型者较 GG 基因型者具有高 LH/FSH 比值及高 TC 水平($P<0.05$,表 2)。

3 讨 论

PCOS 是育龄期妇女一种常见的异质性内分泌疾病,临床表现及近远期并发症复杂多样^[2-6],严重影响女性生殖及内分泌健康。但 PCOS 的病因至今尚未阐明,目前多数学者认为 PCOS 的发病可能与基因调控有关。人体内基因具有自然变异和多态性的特征,基因学研究有助于了解人类复杂疾病。最近被确认的 FSHβ-211G→T,位于 FSHβ 基因启动子区的第 211 个位点(rs10835638)^[10]。有研究^[11-12]表明,FSHβ-211G→T 对生育期女性的下丘脑-垂体-卵巢轴(hypothalamic pituitary ovarian axis, HPO)有一定的影响,FSHβ 基因和 FSH 受体(follicle stimulating hormone receptor, FSHR)基因联合突变可能会影响血清 FSH 水平。有研究^[13]认为女性 HPO 轴有影响的基因变异对 PCOS 的相关表型也有一定的影响。

本研究发现 FSHβ-211G→T 基因变异具有两个基因型 GG 及 GT,在 PCOS 人群中 FSHβ-211G→T

表 2 病例组与对照组不同 FSHβ-211G→T 基因型的内分泌代谢指标比较($\bar{x} \pm s$)				
指标	病例组($n=100$)		对照组($n=154$)	
	GG	GT	GG	GT
FSH(mIU/mL)	6.77 ± 1.93	5.18 ± 1.41*	7.36 ± 2.37	6.76 ± 1.21
LH(mIU/mL)	10.78 ± 6.53	11.91 ± 6.85	4.37 ± 1.99	7.45 ± 7.20
LH/FSH	1.65 ± 0.93	2.31 ± 1.14*	0.65 ± 0.37	1.06 ± 0.87*
E2(pg/mL)	39.98 ± 21.45	35.71 ± 18.67	39.99 ± 24.06	40.40 ± 19.46
T(ng/mL)	0.62 ± 0.35	0.56 ± 0.14	0.60 ± 2.84	0.37 ± 0.13
P(ng/mL)	0.91 ± 0.72	0.79 ± 0.40	1.18 ± 2.59	0.85 ± 0.30
PRL(ng/mL)	14.86 ± 6.72	28.23 ± 43.88	16.72 ± 8.46	15.80 ± 4.84
TSH(μIU/mL)	2.68 ± 3.39	4.07 ± 5.89	2.21 ± 1.09	1.75 ± 0.58
SHBG(nmol/L)	53.09 ± 85.58	41.65 ± 72.40	63.71 ± 63.24	86.91 ± 116.27
DHEAS(μg/dL)	306.95 ± 60.34	321.50 ± 63.67	308.41 ± 138.31	326.52 ± 113.69
FPG(mmol/L)	4.85 ± 0.53	4.94 ± 0.73	4.69 ± 0.50	4.69 ± 0.43
FINS(μU/mL)	11.27 ± 6.75	13.08 ± 8.88	8.31 ± 7.82	8.16 ± 3.50
HOMA-IR	2.44 ± 1.64	2.88 ± 2.50	1.76 ± 1.69	1.71 ± 0.78
TC(mmol/L)	4.74 ± 0.77	5.17 ± 0.85	4.86 ± 0.79	5.43 ± 0.75*
TG(mmol/L)	1.76 ± 4.30	1.34 ± 4.32	0.98 ± 0.74	0.96 ± 0.70
LDL(mmol/L)	2.83 ± 0.71	3.07 ± 0.71	2.87 ± 0.05	3.17 ± 0.77
HDL(mmol/L)	1.40 ± 0.38	1.55 ± 0.33	1.53 ± 0.35	1.73 ± 0.55

注:与本组 GG 基因型比较,* $P<0.05$

突变 GT 基因型频率为 14.0%, T 等位基因频率高于对照组 (PCOS 为 7.0%, 对照组为 3.2%), 两组间 FSH β -211G \rightarrow T 基因型分布存在差异 ($P < 0.05$), 表明该单核苷酸位点多态性对 PCOS 的发病易感性有影响, 并明确了 FSH β -211G \rightarrow T 基因多态性对 PCOS 的内分泌代谢有一定的影响。有学者研究发现^[12], FSH β -211G \rightarrow T 突变基因 T 与高 FSH 水平及高 LH 水平相关。但本研究发现, FSH β -211G \rightarrow T 与血清 FSH 水平之间的关系明显不同于先前的研究, 这可能与不同人种、不同地区群体的基因突变频率差异及研究设计方案、分析方法的不同有关。在 PCOS 患者中 FSH β -211G \rightarrow T 多态性对 FSH 及 LH/FSH 比值有影响, 携带 GT 基因型的患者较 GG 基因型患者具有低 FSH 水平及高 LH/FSH 比值 ($P < 0.05$), 同时 TC 水平也有上升趋势; 在对照组中携带 GT 基因型者较 GG 基因型者具有高 LH/FSH 比值及高 TC 水平 ($P < 0.05$), 而 FSH 水平也有下降趋势; 该基因多态性对 LH、FPG、FINS、LDL、HDL、DHEAS、SHBG 等指标无明显影响。因此, 笔者推断 FSH β 基因启动子区的多态性通过影响 FSH、TC 水平来影响 PCOS 的内分泌代谢。根据 Falck 在 1959 年提出的学说^[14]: 在颗粒细胞中, FSH 与颗粒细胞上的 FSHR 结合, 激活颗粒细胞内的芳香化酶活性, 将雄激素转化为雌激素。因此笔者推测, FSH β -211G \rightarrow T 通过影响 FSH 水平, 改变 PCOS 体内雄激素和雌激素的水平, 引起激素水平的紊乱, 以致 PCOS 临床内分泌代谢的变化, 最终导致 PCOS 的发生。总之 FSH β -211G \rightarrow T 基因多态性对 PCOS 的发病易感性及临床内分泌特征有影响, FSH β -211G \rightarrow T 基因多态性可能是 PCOS 发病的原因之一。

本研究对 FSH β -211G \rightarrow T 与 PCOS 的相关性进行首次研究, 选取的人群仅为中国福建汉族女性人群, 具有一定的局限性, 有待对更多地区、更多人种进行研究。

【参考文献】

[1] Li R, Zhang Q, Yang D, et al. Prevalence of polycysticovary syndrome in women in China: a large community-based study [J]. Hum Reprod, 2013, 28(9): 2562-2569.

[2] Moran LJ, Misso ML, Wild RA, et al. Impaired glucose tolerance, type 2 diabetes and metabolic syndrome in polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis [J]. Hum Reprod Update, 2010, 16(4): 347-363.

[3] 徐碧红, 张 凤. 肥胖与非肥胖多囊卵巢综合征患者内分泌激素对比研究 [J]. 华南国防医学杂志, 2011, 25(5): 446-447.

[4] Boomsma CM, Eijkemans MJ, Hughes EG, et al. A meta-analysis of pregnancy outcomes in women with polycystic ovary syndrome [J]. Hum Reprod Update, 2006, 12(6): 673-683.

[5] Haoula Z, Salman M, Atiomo W. Evaluating the association between endometrial cancer and polycystic ovary syndrome [J]. Hum Reprod, 2012, 27(5): 1327-1331.

[6] Rizzo M, Berneis K, Spinass G, et al. Long-term consequences of polycystic ovary syndrome on cardiovascular risk [J]. Fertil Steril, 2009, 91(4 Suppl): 1563-1567.

[7] Rotterdam. ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and longterm health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS) [J]. Fertil Steril, 2004, 81(1): 19-25.

[8] 吴静静, 刘锦霞, 吴元赓, 等. 观察二甲双胍和螺内酯对多囊卵巢综合征患 ghrelin 的影响 [J]. 东南国防医药, 2009, 11(4): 289-292.

[9] 罗助荣, 林 毅, 张克己, 等. 福建地区汉族人群骨保护素基因 rs2073617T/C 多态性与急性冠脉综合征病变程度的关系 [J]. 东南国防医药, 2011, 13(5): 385-388.

[10] Grigoriou M, Punab M, Ausmees K, et al. FSHB promoter polymorphism within evolutionary conserved element is associated with serum FSH level in men [J]. Hum Reprod, 2008, 23(9): 2160-2166.

[11] Schüring AN, Busch AS, Bogdanova N, et al. Effects of the FSH- β -subunit promoter polymorphism 211G \rightarrow T on the hypothalamic-pituitary-ovarian axis in normally cycling women indicate a gender-specific regulation of gonadotropin secretion [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2013, 98(1): E82-E86.

[12] La Marca A, Papaleo E, Alvisi C, et al. The combination of genetic variants of the FSHB and FSHR genes affects serum FSH in women of reproductive age [J]. Hum Reprod, 2013, 28(5): 1369-1374.

[13] Valkenburg O, Uitterlinden AG, Piersma D, et al. Genetic polymorphisms of GnRH and gonadotrophic hormone receptors affect the phenotype of polycystic ovary syndrome [J]. Hum Reprod, 2009, 24(8): 2014-2022.

[14] 谢 幸, 苟文丽. 妇产科学 [M]. 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 19.

(收稿日期: 2015-03-20; 修回日期: 2015-04-10)

(本文编辑: 张仲书; 英文编辑: 王建东)