

· 论 著 ·

黄体生成素 β 基因 Gly102Ser 多态性与多囊卵巢综合征及卵巢早衰的关系

陈绚丽, 杨菁, 徐望明, 肖卓妮

(武汉大学人民医院生殖医学中心, 武汉 430060)

[摘要] 目的: 探讨黄体生成素(LH) β 亚单位基因 Gly102Ser 多态性与中国妇女多囊卵巢综合征(PCOS)及卵巢早衰(POF)的关系。方法: 应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析, 对 70 例 PCOS 患者、38 例 POF 患者及 90 名正常对照者进行了 LH β 基因 Gly102Ser 变异多态性分析。结果: LH β 基因 A、G 等位基因频率在 PCOS 组、POF 组和对照组分别为 0.100、0.900; 0.079、0.921; 0.017、0.983。PCOS 和 POF 组 A 等位基因频率均显著高于对照组($\chi^2=10.872$ 和 4.413 , $P<0.05$)。PCOS 患者 LH β 基因 G/A (AA、GA) 出现率显著高于对照组妇女($\chi^2=4.233$, $P<0.05$)。POF 组各基因型频率与对照组比较差异无显著性。结论: 在 PCOS 和 POF 人群中都存在着 LH β 基因 Gly102Ser 多态性, 此多态性与 PCOS 有相关性而与 POF 无相关性。LH β 基因 Gly102Ser 多态性可能是 PCOS 发病的危险因素之一。

[关键词] 多囊卵巢综合征; 卵巢早衰; 黄体生成素; 基因多态性

[中图分类号] R 711.75 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)11-1199-03

Association between luteinizing hormone β -subunit gene Gly102Ser polymorphism and polycystic ovary syndrome and premature ovarian failure

CHEN Xuan-Li, YANG Jing, XU Wang-Ming, XIAO Zhuo-Ni (Reproductive Medical Center, the People's Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the relationship between luteinizing hormone (LH) β -subunit gene Gly102Ser polymorphism and polycystic ovary syndrome and premature ovarian failure. **Methods:** The LH β gene Gly102Ser polymorphism was analyzed in polycystic ovary syndrome (70 cases), premature ovarian failure (34 cases) and normal group (90 cases) by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). **Results:** The LH β gene allelic frequencies of A, G were 0.100, 0.900; 0.079, 0.921; 0.017, 0.983 in PCOS, POF and control groups, respectively. The A allele frequencies of LH β gene in PCOS and POF were higher than those in control groups ($\chi^2=10.872$, 4.413 , $P<0.05$). The frequency of variants (AA, GA) of LH β gene Gly102Ser polymorphism site in PCOS was significantly higher than that of control subjects ($\chi^2=4.233$, $P<0.05$). There was no significant difference in genotype frequencies between POF and control groups ($P>0.05$). **Conclusion:** The LH β gene Gly102Ser polymorphism exists in both PCOS and POF people, which is associated with PCOS but not related to POF, and might be a risk factor for PCOS.

[KEY WORDS] polycystic ovary syndrome; premature ovarian failure; luteinizing hormone; polymorphism

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(11): 1199-1201]

* 多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)是因月经调节机制异常所致的临床综合征, 其症候群主要为闭经、多毛、肥胖、不孕和双侧卵巢囊性增大。卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF) 指妇女在 40 岁之前出现闭经, 伴有高促性腺激素血症及低性腺激素血症。PCOS 和 POF 均为育龄妇女月经失调及不孕的常见原因, 黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 的异常是这两种卵巢疾病的共同表现之一。LH 在卵泡发育、卵子成熟及排卵过程中起着非常重要的作用。有研究表明, LH β 亚单位基因多态性可能与妇女不孕及月经病有关^[1]。我们对 LH β 基因 Gly102Ser 多态性和 PCOS 及 POF 的关系进行研究。

1 材料和方法

1.1 研究对象 选择 2002 年 10 月至 2003 年 11 月在我院生殖中心及妇产科门诊就诊的 PCOS 患者 70 例、POF 患者 38 例及正常查体妇女 90 例, PCOS 组平均年龄 (29.0 ± 2.2) 岁, 符合诊断标准^[2]: (1) 临床上表现为月经稀发 (周期 >35 d)、频发 (周期 <25 d)、闭经、功血, 不同程度的多毛, 痤疮, 肥胖和不孕等; (2) B 超或腹腔镜检查示多囊卵巢及卵巢无排卵现象 (一侧或双侧卵巢卵泡数 ≤ 10 个, 直径 ≤ 10 mm); (3) 近 1~2 个月未用类固醇激素, 月经周期

* [作者简介] 陈绚丽(1979-), 女(汉族), 硕士生

* Corresponding author. E-mail: DrYangQing@hotmail.com

第 3 天或闭经期(B 超未见优势卵泡)激素水平: 血清 LH 与卵泡刺激素(FSH)水平的比值 > 2 , 和(或)睾酮 $> 2.2 \text{ nmol/L}$ (或)雄烯二酮 $> 9.0 \text{ nmol/L}$; (4)排除高催乳素血症、甲状腺疾病、库欣综合征等其他雄激素增高性疾病。POF 组平均年龄 (31.5 ± 3.0) 岁,同时符合以下标准^[3]: (1)年龄在 40 岁或以下,超过 3 个月经周期无月经来潮; (2)至少 2 次不同日血清 FSH $> 40 \text{ IU/L}$ 或 LH $> 30 \text{ IU/L}$, 雌二醇(E₂) $< 25 \text{ pg/ml}$; (3)血清催乳素(PRL)水平正常。所有 POF 患者均无卵巢器质性疾病并排除有卵巢手术、放疗、化疗等明显卵巢损害因素的病例。正常对照组平均年龄 (30.0 ± 2.6) 岁,为排除以上疾病、月经周期正常而无卵巢因素异常者。

1.2 基因组 DNA 的提取 全部患者和对照组各抽取外周静脉血 5 ml, 肝素钠抗凝, 经蛋白酶 K 处理, 酚/氯仿抽提和乙醇沉淀的方法分离基因组 DNA。经紫外分光光度计检测所提 DNA 的浓度和纯度。

1.3 聚合酶链反应 根据文献设计引物^[4], 引物扩增 LH β 基因的一段基因, 扩增片段大小为 395 bp, 此片段含 Gly102Ser 多态位点, 上下游引物序列分别为: 5'-AGT CTG AGA CCT GTG GGG TCA GCT T-3', 5'-GGA GGA TCC GGG TGT CAG GGC TCC A-3', 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。扩增反应总体积 50 μl , 包含引物 10 ng, Taq 聚合酶 1 U, MgCl₂ 2 mmol/L, dNTP 200 mmol/L, 反应程序为 94 预变性 5 min, 94 变性 1 min, 65 退火 1 min, 70 延伸 1 min, 进行 30 个循环后 72 延伸 10 min。实验中设阴性对照(不含模板)。

1.4 限制性内切酶消化 酶切反应在 20 μl 体系中进行, 其中包括 PCR 产物 10 μl , 内切酶 Eco0109 I (10 U/ μl , MBI 公司) 2 μl , 10 \times 缓冲液 2.5 μl , 混匀后置 37 水浴, 消化 2 h。经 2% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色检测基因酶切产物。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 统计软件分析, 基因型及等位基因频率分布采用 χ^2 检验及 Fisher's 精确检验。

2 结果

2.1 LH β 亚单位基因的 Eco0109 I 酶切分析

LH β 亚单位基因第 3 外显子内存在第 1502 碱基位

点 G A 点突变, 导致第 102 位密码子编码产物由甘氨酸(Gly)变成丝氨酸(Ser), PCR 产物经限制性内切酶 Eco0109 I 酶切消化后产生不同的特异性片段, 形成 3 种基因型, 正常纯合子(GG 型)酶切片段为 269 和 126 bp, 突变纯合子(AA 型)酶切位点被取消, 为一条 395 bp 片段, 突变杂合子(GA 型)酶切片段为 395、269 和 126 bp (图 1)。

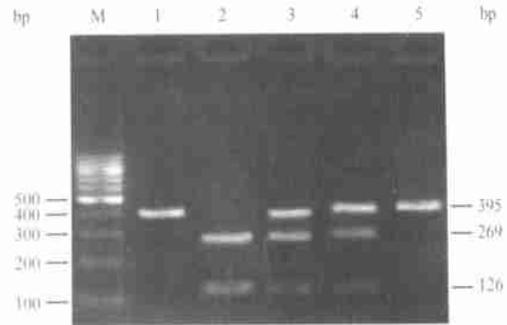


图 1 LH β 基因 Gly102Ser 多态性检测电泳图

Fig 1 Electrophoresis analysis of LH β gene Gly102Ser polymorphism

M: DNA marker; 1: Undigestion product;

2: Wild group; 3, 4: Heterozygous group; 5: Homozygous group

2.2 LH β 亚单位基因型与等位基因频率分布 3 组 LH β 基因型和等位基因频率见表 1, 所调查人数群体基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡。LH β 基因 A、G 等位基因频率在 PCOS 组、POF 组和对照组分别为 0.100、0.900; 0.079、0.921; 0.017、0.983。PCOS 和 POF 组 A 等位基因频率均显著高于对照组 ($\chi^2 = 10.872$ 和 4.413 , $P < 0.05$)。PCOS 患者 LH β 基因 G A (AA、GA) 出现率高于正常妇女 ($\chi^2 = 4.233$, $P < 0.05$)。PCOS 组 LH β 基因 AA 基因型频率显著高于对照组 (Fisher's 精确检验, $P = 0.028$), POF 组各基因型频率与正常对照组比较差异无显著性(表 1)。

3 讨论

PCOS 和 POF 均为妇科内分泌的复杂病症, 病因至今未明, 很多研究显示遗传因素在 PCOS 和 POF 发病中具有重要作用。促性腺激素及其受体基因已被列为这两种卵巢疾病可能的候选基因。LH 和 FSH、人绒毛膜促性腺激素(hCG)及甲状腺刺激素(TSH)同属于糖蛋白激素家族, 均由一个共同的 α 亚单位和一个特异性 β 亚单位组成, 它们通过非共价键形成异二聚体。

表 1 PCOS 和 POF 患者 LH β 亚单位基因型与等位基因频率Tab 1 Allele frequencies and genotype frequencies of LH β gene in PCOS and POF patients

Groups	N	LH β genotype (frequency)			LH β allele (frequency)	
		AA	GA	GG	A	G
POF	38	2(0.053)	2(0.053)	34(0.894)	6(0.079)*	70(0.921)
PCOS	70	6(0.086)*	2(0.028)	62(0.886)	14(0.100)*	126(0.900)
Control	90	1(0.011)	1(0.011)	88(0.978)	3(0.017)	177(0.983)

* $P < 0.05$ vs control group

LH β 亚单位由单个基因编码, 该基因定位于 19q13.3, 全长 1.65 kb, 由 3 个外显子组成。LH β 基因存在多种突变, 突变可能导致与黄体功能缺陷的一系列表型如不排卵、黄体不足、未成熟卵泡排卵等^[5], 可导致月经病、PCOS、习惯性流产及不孕, 机制尚不清楚, 可能与突变的 LH 不能与其受体正常作用有关。1996 年 Roy 等^[6]通过单链构象多态性检测发现了 LH β 基因外显子 3 上存在 Gly102Ser 突变。甘氨酸(Gly)是形成蛋白质内疏水区的重要部分, 而丝氨酸(Ser)含极性侧链, 第 102 位的甘氨酸被丝氨酸取代会导致分子内出现亲水作用力, 从而改变了 LH 的正常结构和功能^[7]。

本研究结果显示 PCOS 和 POF 组 LH β 基因 A 等位基因频率均显著高于对照组, PCOS 患者 LH β 基因 AA 基因型频率显著高于对照组, 但基因型分布在 POF 和对照组无显著性差别, 说明 LH β 基因 Gly102Ser 多态性与 PCOS 有相关性($P < 0.05$), 该多态性可能是 PCOS 发病的危险因素之一。而在 POF 人群中, LH β 基因 Gly102Ser 变异仅为一种多态性但与 POF 疾病发生无关。研究认为, POF 可能的发生机制包括原始生殖细胞数目减少, 卵泡闭锁、凋亡加速, 卵泡成熟障碍及生殖细胞的后天损耗等, 这些均与多基因的作用有关。

Kim 等^[8]研究显示该突变在韩国的 PCOS 妇女中很罕见。不同的研究表明该疾病在不同种族中及不同的地理环境下可能存在不同的病因。目前认为 PCOS 是多基因遗传性疾病, 其家族聚集现象提示遗传因素的作用^[9]。现有很多研究发现 PCOS 与胰岛素抵抗有较密切的关系, 有相当一部分患者外周组织对胰岛素的敏感性降低, 其中胰岛素、胰岛素受体及受体底物的基因突变被认为可能与具有胰岛素抵抗的 PCOS 患者的发病有关。本研究仅表明, LH β 基因可能是 PCOS 的相关基因之一, 较多的

PCOS 患者可能存在 LH β 基因 Gly102Ser 多态性, LH β 基因 AA、GA 基因型可能是 PCOS 的易患基因型, 与 PCOS 患者遗传易感性增高有关。我们仅对 LH β 基因 Gly102Ser 多态性进行了研究, 由于存在连锁不平衡, 我们所观察的结果可能是由等位基因中任一基因的行为所致, 或者是由于其他等位基因和这些基因连锁不平衡的缘故, 也可能是多种基因突变共同作用的结果, 因此仍有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Sukanuma N, Furui K, Furuhashi M, et al. Screening of the mutations in luteinizing hormone β subunit in patients with menstrual disorders[J]. *Fertil Steril*, 1995, 63(5): 989-995.
 - [2] 毛文伟, 俞琳, 陈咏健, 等. 肿瘤坏死因子 α 基因多态性与多囊卵巢综合征发病的关系[J]. *中华妇产科杂志*, 2000, 35(9): 536-539.
 - [3] 马润玖, 马润章, 何世荣. 卵巢早衰[J]. *国外医学·妇产科学分册*, 1997, 24(2): 73-75.
 - [4] Liao WX, Roy AC, Chan C, et al. A new molecular variant of luteinizing hormone associated with female infertility[J]. *Fertil Steril*, 1998, 69(1): 102-106.
 - [5] Layman LC. Mutations in human gonadotropin genes and their physiologic significance in puberty and reproduction[J]. *Fertil Steril*, 1999, 71(2): 201-218.
 - [6] Roy AC, Liao WX, Chen Y, et al. Identification of seven novel mutation in LH β subunit gene by SSCP[J]. *Mol Cell Biochem*, 1996, 165(4): 151-153.
 - [7] Huhtaniemi I, Jiang M, Nilsson C, et al. Mutations and polymorphisms in gonadotropin genes[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1999, 151(1): 89-94.
 - [8] Kim NK, Nam YS, Ko JJ, et al. The luteinizing hormone β subunit exon 3(Gly102Ser) gene mutation is rare in Korean women with endometriosis and polycystic ovary syndrome[J]. *Fertil Steril*, 2001, 75(6): 1238-1239.
 - [9] Legro RS. Polycystic ovary syndrome: phenotype to gene type[J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1999, 289(3): 379-396.
- [收稿日期] 2004-04-18 [修回日期] 2004-08-18
[本文编辑] 孙岩