

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.23.002

雌激素受体基因单核苷酸多态性与特发性矮小的相关性研究

袁 意¹, 杨 玉^{1△}, 黄 慧¹, 王 莹²

(1. 江西省儿童医院内分泌科, 南昌 330006; 2. 国家人类基因组南方研究中心, 上海 201209)

摘 要:目的 分析中国汉族人群的特发性矮小(ISS)患儿以及正常人群中雌激素受体(ER)基因的多态性,并结合临床资料比较分析,以探讨 ISS 的可能发病机制。方法 对 355 例 ISS 患儿和 345 位正常对照的 ER 基因的单核苷酸多态性(SNP)进行分型,分析此位点的等位基因频率及基因型频率在两组人群之间的差异。并对不同基因型的临床指标进行差异分析比较。结果 rs6557177 T 等位基因病例组较对照组降低,差异有统计学意义($P=0.021$, $OR=0.624$)。2 种不同基因型的临床指标进行差异分析比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 ER α 位点 rs6557177 与 ISS 相关,此位点等位基因 T 可能为矮小的保护性基因,可降低矮小风险。C 基因和 T 基因分组临床指标(身高、体质量、BMI、IGF-1、IGFBP3)分析比较,差别不大。

关键词:特发性矮小;雌激素受体;单核苷酸多态性;胰岛素样生长因子 1

中图分类号:R725.8

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)23-2980-03

Research of idiopathic short stature and estrogen receptor gene polymorphism

Yuan Yi¹, Yang Yu^{1△}, Huang Hui¹, Wang Ying²

(1. Department of Endocrinology, Children's Hospital of Jiangxi Province, Nanchang, Jiangxi 330006, China;

2. National Human Genome Research Center, Shanghai 201209, China)

Abstract: Objective This study was to investigate the association of certain single nucleotide polymorphisms(SNPs) of the ER with genetic susceptibility to ISS. Methods Genomic DNA was extracted from peripheral blood of children with ISS($n=355$) and of normal growth and development individuals as controls from Jiangxi province ($n=345$). The association between the ER gene polymorphisms with the height-related clinical traits was analysed. Results The allele T of rs6557177 is significantly lower in the ISS group than in the control group($P=0.021$, $OR=0.624$). The clinical indexes of two kinds of different genotypes were analyzed and compared, there was no statistical difference($P>0.05$). Conclusion The allele T of rs6557177 of ER gene is a protection factor of ISS. C gene and T gene grouping clinical parameters (height, weight, IGF-1, IGFBP3, E2 and BMI) were analyzed and found no statistically significant difference.

Key words: idiopathic short stature; estrogen receptor; SNP; IGF-1

人体身高增长是一个由遗传和环境因素共同作用的复杂过程。遗传在此过程中的重要作用已被广泛认识,对非生长激素(growth hormone, GH)缺乏的特发性矮小(idiopathic short stature, ISS)的发生可能与多基因缺陷有关。目前,公认引起矮小症生理病理机制:(1)GH-IGF-1 轴通路及相关基因;(2)调控骨生长板的相关基因及激素。许多临床观察和试验已经证实,在青春期,雌激素对身材或者骨骼发育的影响主要是通过其对生长板软骨细胞直接发挥作用所致。雌激素(estrogen)和雌激素受体(estrogen receptor, ER)是青春期中引起身高突增和骨骺愈合的关键因素,进而影响身高^[1-3]。南方基因中心王莹在《特发性矮小相关基因多态性和矮小遗传易感性的研究》中报道,定位于染色体 6q25.1 的雌激素受体基因 α 与骨生长板的成熟与儿童身高密切相关。因此,本研究选取 ER 基因多态性作为切入点,进一步研究其与 ISS 的发病关系。

ISS 的发生是一个多基因调控和影响下发生,目前已有学者对生长激素受体(GHR)、胰岛素样生长因子受体(IGF-IR)等基因位点与 ISS 进行研究。因此,通过对 ER α 基因单核苷酸多态性与 ISS 的研究,进一步了解其与 ISS 的发病关系,为 ISS 病因研究提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

1.1.1 病例组 选取 2001~2009 年在江西省儿童医院内分

泌科(大多来自江西省各地)就诊的 ISS 患儿 355 例,其中,男 252 例,女 103 例。临床入选 ISS 标准:(1)身高低于同年龄、同性别儿童 2SD;(2)生长激发试验至少一项 GH 峰值大于 10 ng/mL;(3)血常规、甲状腺功能、肝肾功能等检查均无异常;(4)出生时的身长和体质量均在正常范围,剔除小于胎龄儿和足月小样儿;(5)排除遗传代谢性、骨骼异常、染色体异常以及慢性疾病。

1.1.2 正常对照组 为 2008 年就读于南昌华东理工大学研究生新生共 345 例,其中,男 165 例,女 180 例。入选标准:(1)身高在同性别正常人的 $\pm 2SD$ 之间,男大于 162 cm,女大于 152 cm;(2)体质量指数(BMI)范围为 17~23 kg/m²。

1.2 研究方法

1.2.1 主要材料 Centrifuge 5415D 台式离心机(Eppendorf 公司),Nanodrop 公司核酸蛋白测定仪 ND1000DNA,Snapshot 平台所需相关试剂。

1.2.2 基因组 DNA 提取 抽取病例组和对照组空腹静脉血 2 mL,乙二胺四乙酸二钾抗凝,按常规酚氯仿-异戊醇法提取基因组 DNA, -20℃ 冰箱保存备用。

1.2.3 候选基因单核苷酸多态性(SNP)位点的筛查 理论依据连锁不平衡的标签 SNP 策略,无需对所有 SNP 进行检测,只需对其中较少一部分的标签 SNP 进行分析,就可以覆盖到所有的核苷酸序列。目前,国际上较为公认网站是在 HapMap

表 1ISS 患儿 rs6557177 位点的基因型与 ISS 关联

rs6557177	基因型	病例组[n(%)]	对照组[n(%)]	P	OR	95%CI	χ^2
	CC	300(84.4)	248(71.9)	0.027			6.74
	CT	50(14.1)	88(25.5)				
	TT	5(1.5)	8(2.3)				
C 显性模型	CC+CT	350(98.5)	336(97.3)	0.251	0.421	0.084~2.102	0.427
	TT	5(1.5)	8(2.3)		1.000		
T 显性模型	TT+CT	55(15.6)	96(28.8)	0.021	0.624	0.402~0.969	6.11
	CC	300(84.4)	248(71.2)		1.000		

数据库和美国国立生物技术信息中心(national center for biotechnology information,NCBI),此网站发布的中国北京汉族人群(Han Chinese in Beijing,China,CHB)亚群 SNP 频率选择标签 SNP 位点,在其中选了 6 个优化标签 SNP 位点 rs6557177、rs1884049、rs3020429、rs3798575、rs3778090、rs3798757。按照 SNP 在病例组和对照组中基因型频率的分布是否符合 Hardy-Weinberg 平衡来选择位点(PLINK-doc-1.04 统计分析软件)。由于患者样本中的 SNP 会受到选择等因素的影响,可能表现出偏离平衡。根据检验结果,HWE<0.001 的 SNP 位点则不符合 Hardy-Weinberg 平衡,剔除位点后,提示 rs6557177 位点可能与 ISS 存在相关性,针对此位点进行验证。

设计 rs6557177 位点其上游引物及下游引物:5'-GGC CCC CAT CCC TTG GTC AAA-3',制成 PCR 样本。

1.2.4 等位基因类型 南方基因中心 SnaPshot 技术平台 Genemapper 基因分型系统对电泳样本 SNP 分型,获得分型文件,得出 rs6557177 位点存在等位基因 C 和 T,一个等位基因上存在的基因类型可为:CC、CT、TT。

1.3 统计学处理 计算雌激素受体上等位基因 rs6557177 (C/T)在 ISS 小患儿及正常人群中的发生频率,计算其 3 种基因型(CC、TT、CT)在 ISS 患儿及正常人群中的发生频率。采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,计数资料采用 χ^2 检验,用秩和检验(非正态分别参数)或 *t* 检验(正态分布参数)分析基因型与临床参数的关系,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

通过统计分析基因位点 rs6557177 在病例组与对照组间 CC 基因型频率分别为 84.4%和 77.2%,差异有统计学意义($\chi^2=6.74,P=0.027$),该位点在 T 显性模型(Dominant)下,病例组中 TT+CT 患者比例为 15.6%,CC 占 84.4%;而对照组中 TT+CT 占 28.8%,CC 占 71.2%,两组基因型频率分布比较差异有统计学意义(*P*=0.021)。提示 T 可能为矮小的保护性基因,可降低矮小风险,T 携带者患病风险降低(*OR*=0.624,95%*CI*:0.402~0.969),见表 1。

Rs6557177 此位点基因型及 T 显性模式(TT+TC)基因型的各项临床指标(HtSDS、体质量 SDS、BMI、IGF-1SDS、IGFBP3SDS、THSDS)进行比较分析,采用标准差以摒除年龄、性别对身高、体质量以及 IGF-1、IGFBP3 的影响。用秩和检验(非正态分别参数)或 *t* 检验(正态分布参数)分析基因型与临床参数的关系,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义,未能发现阳性结果(表 2)。

表 2rs6557177 显隐性模式下的临床指标差异比较

项目	基因型	$\bar{x}\pm s$	P
HtSDS	TT+TC	-3.15±1.05	0.704
	CC	-3.11±0.98	
体质量 SDS	TT+TC	-1.76±1.24	0.832
	CC	-1.74±1.42	
BMI(kg/m ²)	TT+TC	15.15±2.708	0.450
	CC	15.06±2.549	
IGF-1SDS	TT+TC	195.72±147.702	0.597
	CC	206.06±144.380	
IGFBP3SDS	TT+TC	-0.72±1.66	0.928
	CC	-0.79±1.59	
E ₂ (pg/mL)	TT+TC	15.94±4.13	0.352
	CC	15.64±4.39	

Ht:遗传靶身高;HtSDS:身高标准差积分;E₂:雌二醇;IGF-1:胰岛素样生长因子 1;IGFBP3:胰岛素样生长因子结合蛋白 3。

3 讨 论

下丘脑-垂体的 GHRH-GH-IGF1 轴对人体生长发育的内分泌调节至关重要。下丘脑分泌生长激素释放激素(GHRH)及生长抑素(GHIF)调节垂体前叶释放生长激素(GH),生长激素与生长激素受体(GHR)结合形成配体-受体复合物,再由受体介导激发一系列生化反应,发挥生物学作用。GHR 广泛分布于人体的各个器官和组织中,如肝脏、肌肉、肾脏、脂肪等多个器官,其中以肝脏 GHR 含量最高。GH 与 GHR 结合促使外周组织合成分泌 IGF-1,IGF-1 作用于骨骼生长软骨板,刺激骨骼生长发育^[4-5]。儿童长高的过程就是生长板下表面软骨细胞不断地增殖,软骨基质不断被消耗、形成新骨,从而到达骨骼生长拉长的过程,生长板中的软骨细胞只有经过上述过程协调完成,才能保证长骨的正常生长。激素对生长板的发育也起着极其重要的调控作用。(1)甲状腺素:研究显示各区软骨细胞及成骨母细胞皆有甲状腺素受体存在,调节生长板 GH 受体表达,通过 GH 间接促进软骨生长成熟。(2)性激素:性激素对长骨生长有直接和间接作用机制,人和灵长类动物、大鼠的性类固醇激素影响生长激素分泌。软骨增殖区及肥大细胞区有丰富的雌激素和孕激素受体,低浓度雌激素伴高浓度 GH 促进青春期生长加速,高浓度雌激素则可促进细胞分化,骨骺融合(无论生长激素浓度如何)^[6-7]。

目前的许多临床观察和试验已经证实,在青春期,雌激素

对身材或者说骨骼发育的影响主要是通过其对生长板软骨细胞直接发挥作用所致,雌激素和其受体是青春期身高突增和骨骺愈合的关键因素,直接影响到终身高的形成^[8-9]。若雌激素受体失活的男性患者,在青春期无身高突增表现,但由于雌激素未促使骨骺闭合,在成人期长骨仍可以持续生长。但进一步的作用机制,或者说在生长板局部微环境中,雌激素怎样调控以及影响哪些生长因子,还有待进一步研究。高浓度的雌激素可以促进骨骺快速融合,从而影响成年终身高,因此,关注身高就必须关注雌激素及其生物学效应。

雌激素包括 α 和 β 两种亚型。ER α 基因突变对女性成年终身高有较大影响^[8-9]。雌激素主要与 ER α 相结合进而调节一系列基因的表达,发挥其重要的生理效应。因此,雌激素的最终效应不仅取决于雌激素本身的分泌与代谢,还与 ER α 的表达与功能密切相关,其分子结构或功能的异常都将影响雌激素对靶器官的作用,导致骨骼成熟度的差异,从而影响终身高^[10]。因此,本研究就 ER α 基因位点进行分析,以期发现在 ISS 发生过程中可能存在的因素,进而能够影响和改变这个因素,而推动 ISS 的治疗能更进一步。雌激素受体 ER α 在机体内广泛表达,表明其具有重要的生理及病理意义^[10-11]。ER α 介导的基因转录辅助调节因子是参与调控 ER α 功能的蛋白,通过组蛋白修饰和染色质重塑来调控核受体的生物学功能,此亦是目前公认的调控转录的重要机制之一^[12-13]。雌激素受体 α 基因不同的单核苷酸序列在基因转录水平存在着差异,从而影响着 ISS 的发生,为进一步明确多基因病 ISS 的病因,提供相关参考位点;同时为在此位点基因水平异常的 ISS 治疗提供理论依据和新思路,即通过调节 ER α 基因位点转录水平是否可成为未来治疗 ISS 的一种新兴手段,值得更进一步研究。

矮小发生是下丘脑-垂体-生长激素轴及 IGF-1、软骨系统及局部激素共同作用的结果,多层面、多因素影响导致目前尚无明确病因的 ISS 的发生^[14],是临床医师治疗的难点,也是研究和关注的热点。本研究以雌激素受体基因位点 rs6557177 切入点,发现不同单核苷酸序列与 ISS 存在关联,提示等位基因 T 可能为矮小的保护性基因,可降低矮小风险,T 携带者患病风险降低(OR=0.624)。同时编码这些位点的基因的蛋白及功能也值得进一步的研究,更多样本量的研究亦是进一步探讨病因的必要保证。

参考文献:

- [1] Wit JM, Clayton PE, Rogol AD, et al. Idiopathic short stature: definition, epidemiology, and diagnostic evaluation

[J]. Growth Horm IGF Res, 2008, 18(2):89-110.

- [2] Ziv E, Hu D. Genetic variation in insulin/IGF-1 signaling pathways and longevity[J]. Ageing Res Rev, 2011, 10(2):201-204.
- [3] Weedon MN, Lettre G, Freathy RM, et al. A common variant of HMGA2 is associated with adult and childhood height in the general population[J]. Nat Genet, 2007, 39(10):1245-1250.
- [4] 曾畿生, 王德芬.《现代儿科内分泌学》[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2001:55-61.
- [5] Lettre G. Genetic regulation of adult stature[J]. Current Opinion in Pediatrics, 2009, 21(4):515-522.
- [6] Perola M, Lennard TW. Genome-wide association approaches for identifying loci for human height genes[J]. Best Prac Res Clin Endocrinol Metabol, 2011, 25(1):19-23.
- [7] Ko JM, Park JY, Yoo HW. Common exon 3 polymorphism of the GH receptor (GHR) gene and effect of GH therapy on growth in Korean children with idiopathic short stature (ISS) [J]. Clin Endocrinol, 2009, 70(1):82-87.
- [8] 杨玉, 柯江维, 杨利, 等. 雌激素受体 α 基因多态性与性早熟女童指数的关系[J]. 南昌大学学报, 2011, 51(6):34-36.
- [9] 杨玉, 杨利, 柯江维, 等. 性早熟女孩骨龄与雌激素受体基因多态性的相关性[J]. 实用医学杂志, 2011, 27(18):3277-3279.
- [10] 张岚, 郭豫杰, 鲁维飞, 等. 雌激素受体研究进展[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2006, 12(5):10-11.
- [11] 樊官伟, 何俊. 雌激素及其受体信号转导途径的研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2007, 12(3):266-267.
- [12] 谈智, 王庭槐. 雌激素作用分子机制研究进展[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(10):1422-1426.
- [13] Greene GE, Jason B, Caplan AL, et al. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA[J]. Science, 2006, 51(10):231-234.
- [14] 黄慧, 杨玉, 王伟, 等. 特发性矮小患儿胰岛素样生长因子受体基因单核苷酸多态性研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2011, 13(12):955-958.

(收稿日期:2014-03-08 修回日期:2014-05-24)

(上接第 2979 页)

- [9] Sachdev A, Marmura MJ. Metabolic syndrome and migraine [J]. Front Neurol, 2012, 3:161. doi:10.3389/fneur.2012.00161. ecollection 2012.
- [10] Welch KM, Levine SR. Migraine-related stroke in the context of the international headache society classification of headache [J]. Arch Neurol, 1990, 47(4):458-462.
- [11] 潘飞豹, 周冀英. 偏头痛与脑卒中: 复杂的关联[J]. 重庆医学, 2013, 42(22):2665-2667.
- [12] 李舜伟, 李焰生. 中国偏头痛诊断治疗指南[J]. 中国疼痛医学杂志, 2011, 17(2):65-86.

- [13] 郑安海, 周冀英. 阿米替林预防性治疗偏头痛的研究进展[J]. 重庆医学, 2013, 42(24):2925-2928.

- [14] Headache Classification Committee of the international headache society (IHS). The international classification of headache disorders, 3rd edition (beta version) [J]. Cephalalgia, 2013, 33(9):629-808.
- [15] 魏国平. 发作期偏头痛与高血脂的相关性研究[J]. 现代诊断与治疗, 2012, 23(11):1834-1835.

(收稿日期:2014-01-18 修回日期:2014-04-17)