

DOI: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.06.029

多囊卵巢综合征患者胰岛素受体基因外显子 17 的多态性研究

姚瑶¹ 范俊² 夏宝国² 毕淑娜² 孙宝治^{2△}

(1 青岛大学医学院 山东 青岛 266071; 2 青岛市市立医院妇科 山东 青岛 266071)

摘要 目的:探索胰岛素受体基因 外显子 17 的基因多态性与多囊卵巢综合征(PCOS)的关系,为多囊卵巢综合征的治疗寻找新的途径。**方法:**利用 PCR-SSCP 技术检测 45 例多囊卵巢综合征患者(实验组)与 40 例健康妇女(对照组)全血中胰岛素受体基因外显子 17 位点 1058 的基因多态性,同时测定 PCOS 患者的一般指标及血清学指标。按照体重指数、胰岛素抵抗、有无高雄激素血症比较胰岛素受体基因外显子 17 位点 1058 C、T 等位基因出现的频率。**结果:**实验组患者 T 等位基因出现的频率为 71.2%,明显高于对照组的 25%($P>0.05$);实验组非肥胖组患者中 T 等位基因出现的频率为 69.2%,明显高于肥胖组患者的 25%($P<0.01$),亦高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。根据胰岛素受体基因外显子 17 出现 T、C 基因的频率,将其分为 1、2 两组,1 组出现 T 基因的频率的 BMI(20.34 ± 2.47)明显低于 2 组出现 C 基因的频率的 BMI(26.68 ± 5.52); PCOS 患者胰岛素抵抗组与非胰岛素抵抗组中 INSR 基因外显子 17 出现 T、C 等位基因的频率无明显差别($P>0.05$); PCOS 患者高雄激素组与无高雄激素组中胰岛素受体基因外显子 17 出现 T、C 等位基因的频率无明显差别($P>0.05$)。**结论:**胰岛素受体基因外显子 17 中 T/C 单核苷酸多态性表现与 PCOS 患者的发病密切相关,T 等位基因的高发频率与非肥胖因型 PCOS 患者的发病密切相关;瘦型 PCOS 患者与肥胖型患者胰岛素抵抗的发病机制或许不同;T 等位基的高发频率与 PCOS 的主要临床表现如:胰岛素抵抗、高雄激素血症并无明显相关关系。

关键词:多囊卵巢综合征;胰岛素受体基因;外显子 17;胰岛素抵抗;基因多态性

中图分类号:R711.7, R587.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)06-1113-04

Research on the Polymorphism of Exon 17 of Insulin Receptor in the Women with Polycystic Ovary Syndrome

YAO Yao¹, FAN Jun², XIA Bao-guo², BI Shu-na², SUN Bao-zhi^{2△}

(1 Qingdao university medical college, Qingdao, Shandong, 266071, China;

2 Qingdao Municipal Medical Grope, Qingdao, Shandong, 266071, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the relationship between polymorphism of exon 17 of insulin receptor(INSR) and polycystic ovary syndrome(PCOS), and provide reference for the treatment of PCOS. **Methods:** In this study, PCR-SSCP was used to detect the gene polymorphism of exon 17 of INSR site 1058 across whose full blood of 45 women with PCOS and 40 normal as controls. At the same time, the biochemical, hormonal and so on were also been detected. **Results:** The patients with PCOS occurred T allele with high frequency of the exon 17 of INSR 71.2%, and the frequency in normal women 25% ($P<0.01$), the difference have significance; and the frequency of T allele in the lean group is 69.2% and the obese group 25% ($P<0.05$), the difference have significance. According to the T, C allele frequency of occurrence of the exon 17 of INSR, we divided the patients into two groups: 1 group, which means the 1058 site of the exon 17 of INSR is T allele, 2 group, which is C allele. The BMI of 1 group was lower than that in the 2 group, the differences were significant ($P<0.05$); there was no significance difference between the insulin resistance group and without insulin resistance group with the gene polymorphism in exon 17 of INSR; there was no significance difference between the hyperandrogenemia group and without hyperandrogenemia group with the gene polymorphism in exon 17 of INSR. **Conclusions:** The gene polymorphism in exon 17 of INSR have association with polycystic ovary syndrome in Qingdao of CHINA, T allele high frequency have association with the lean PCOS; the pathogenesis of the obesity and lean patients maybe is different T allele high frequency is not associated with PCOS dependence trait such as insulin resistance and hyperandrogenemia, so this polymorphism is only a pathogenic gene in some patients.

Key words: Polycystic Ovary Syndrome(PCOS); Insulin Receptor Gene; Exon 17; Insulin Resistance; Genetic Polymorphism

Chinese Library Classification: R711.7, R587.1 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)06-1113-04

前言

作者简介:姚瑶(1988-),女,硕士研究生,

E-mail: yoyo2598@126.com

△通讯作者:孙宝治(1956-),男,青岛市立医院妇科主任,主任医师,硕士生导师,主要研究方向:妇科肿瘤及内分泌

(收稿日期:2013-06-20 接受日期:2013-07-20)

多囊卵巢综合征(PCOS)是一种内分泌紊乱及代谢异常的疾病,在育龄期妇女中的发病率约为 7%~10%,占育龄期妇女不孕症的 40%~60%,以慢性持续不排卵及高雄激素血症为主要特点^[1]。流行病学证实 PCOS 的发病特点具有明显的家族聚集性和异质性,并且受到环境因素的影响,PCOS 患者的姐妹或直系亲属中再次发生 PCOS 的概率是普通人群的 5~7 倍^[2]。

迄今为止,PCOS 的发病机制尚不完全清楚。研究发现,其发病机理除了与肥胖、胰岛素抵抗、动脉血管壁硬化及慢性炎症有关外,还与众多基因有关^[3]。越来越多研究认为胰岛素抵抗(insulin resistance)在 PCOS 的发病中起着关键作用,可能是 PCOS 发生的主要病理基础^[4]。胰岛素抵抗所致的高胰岛素血症促进体内雄激素产生过多以及闭经,引起无排卵等生殖功能障碍,也可以促进子宫内膜上皮和间质细胞的生长^[5,6]。胰岛素抵抗的发生主要与受体前、受体和受体后三类因素有关^[7]。近年来,越来越多的学者着重于研究受体因素,因为受体在整个胰岛素信号传导过程中发挥了最重要的作用,其自主磷酸化启动了胰岛素在细胞水平的作用,实现了信号从细胞外到细胞内的跨膜传递^[8]。既往有研究报道,胰岛素受体基因外显子 17 上 1008 位点的基因多态性与 PCOS 的发病有关^[9],而 1058 位点的基因多态性也被证实参与了 PCOS 的发生。本研究旨在研究中国沿海地区如中国青岛地区 PCOS 妇女胰岛素受体基因外显子 17 的基因多态性与 PCOS 发病机理的关系。

1 材料和方法

1.1 临床资料及分组

选取就诊于青岛市立医院东院妇科门诊的 PCOS 患者 45 例作为研究组,平均年龄 22~35 岁,女性,诊断方法参照 2003 年鹿特丹诊断标准,符合以下 3 条特征中 2 条:(1)月经不规律或闭经;(2)有临床或生化的高雄激素血症的表现;(3)B 超下的卵巢多囊样改变。排除其他相关的疾病如先天性肾上腺增生、甲状腺功能紊乱、分泌雄激素的肿瘤、高泌乳素血症。其中月经稀发者 30 例,闭经者 23 例,多毛 8 例。根据 BMI 及 Homa-IRI 再进行分组: BMI $\geq 25\text{kg/m}^2$ 为肥胖型组(n=32), BMI $\leq 25\text{kg/m}^2$ 为非肥胖组(n=13); HOMA-IRI ≥ 1.66 胰岛素抵抗组(n=31), HOMA-IRI ≤ 1.66 非胰岛素抵抗组(n=14)。按照空腹血清总睾酮 $\geq 50\text{ng/dl}$ 分为高雄激素血症组(n=26)和无高雄激素血症组(n=19)。

另选有规律月经周期,排除高雄激素血症的临床及生化表现及 B 超下卵巢有多囊性改变的健康妇女 40 例作为健康对照组,平均年龄在 20~39 岁。

1.2 方法

研究对象均于月经第 3 天早卵泡期晨起后空腹抽静脉血,化学发光法测定性激素全套,空腹血糖水平及胰岛素水平,随后口服 75 g 葡萄糖 2 h 耐量实验及胰岛素释放实验,将 75 g 无水葡萄糖放入 200 mL 纯净水中,在 5 分钟之内服下,从第一口开始计时,2 小时后再次抽取静脉血测定餐后 2 小时的血糖及胰岛素水平。每个研究对象分别留出 1 管肝素化静脉血,离心后去上清存放于零下 20℃ 冰箱内存放,待所有标本收集完全后统一提取 DNA。

具体方法如下:(1)DNA 试剂盒提取外周血基因组 DNA,得到 DNA 水溶液 250 μL , -20℃ 保存。扩增引物:上游引物: 5'-CCAAGGATGCTGTGTAGATAAG-3',下游引物 5'-TCAGGAAAGCCAGCCCATGTC-3'^[4,9],扩增定溶液内含 MgCl_2 5 μL , dNTP 10 mmol/L,两种引物各 10 pmol/L,Tag 聚合酶 0.5U, DNA 产物 0.5 mg,最终定容 50 μL 。94℃ 初步变性 5 min,35 个循环扩增,94℃ 持续 45 s,56℃ 持续 40 s,72℃ 持续 1 min,最终在 72℃ 延伸 10 min。扩增产物长度 317bp^[7,9]。(2)琼脂糖电泳:取 PCR 产物 5 μL ,与缓冲液混合后,经 2% 琼脂糖凝胶进行电泳,产物待进行单链构象多态性电泳分析 SSCP^[4]。(3)SSCP 电泳分析:上样:配方制作 9% 非变性聚丙烯酰胺凝胶。PCR 产物 5 μL ,上样缓冲液 10 μL ,蒸馏水 8 μL ,摇匀 95℃ 变性 5 min,置入凝胶孔中。1× TBE 电泳缓冲液,150v,4 小时,100v,2 小时电泳,1× TBE 液加入 4 μL EB,放入凝胶显色^[7]。(4)对各种条带进行测序。

1.3 统计学分析方法

所有数据采取 SPSS17.0 统计软件进行分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验组胰岛素受体基因 C→T 多态性与体重指数的关系

实验组患者 INSR 基因外显子 17 第 1058 位点 T 等位基因出现的频率为 71.2%,明显高于对照组的 25% ($P > 0.05$); PCOS 非肥胖组患者中 T 等位基因出现的频率为 69.2%,明显高于肥胖组患者的 25% ($P < 0.01$),非肥胖组 PCOS 患者 T 基因出现的频率亦高于对照组,差别具有统计学意义 ($P < 0.05$)。实验组中出现 T 等位基因的患者的 BMI (20.34 ± 2.47) 明显低于出现 C 等位基因患者的 BMI (26.68 ± 5.52),见表 1、2、3。

表 1 实验组与对照组胰岛素受体基因外显子 17 的基因型分布

Table 1 The distribution of INSR exon 17 genotype in the experimental group and the control group

Groups	Case	T/T	C/T	C/C
Experimental group	45	25 (55.6%)	7 (15.6%)	13 (28.8%)
Control group	40	6 (15%)	4 (10%)	30 (75%)

表 2 实验组肥胖患者与非肥胖患者胰岛素受体基因多态性

Table 2 Obese and no-obese patients in the experimental group with INSR polymorphisms

	Obese in experimental (%)	No-obese in experiment (%)	Control (%)
Number of T allele	7 (25%)	9 (69.2%)	10 (25%)
Number of C allele	25 (75%)	4 (30.8%)	30 (75%)

表 3 C、T 等位基因多态性与 BMI 之间的关系

Table 3 The relationship between the C, T allele polymorphisms with BMI

	Numbers	BMI
Frequency of T	16	20.34± 2.47
Frequency of C	29	26.68± 5.52

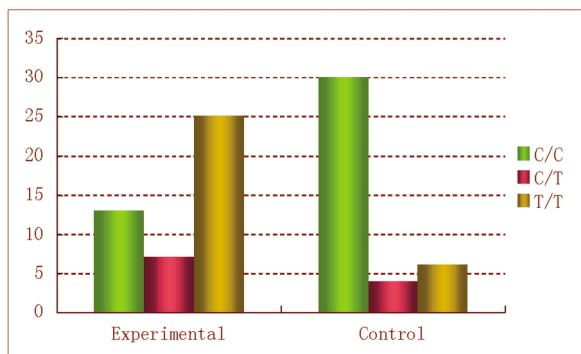


图 1 PCOS 患者与正常人群胰岛素受体基因外显子 17 的基因型频率分布

Fig.1 The distribution of INSR exon 17 genotype frequency in the normal and PCOS groups

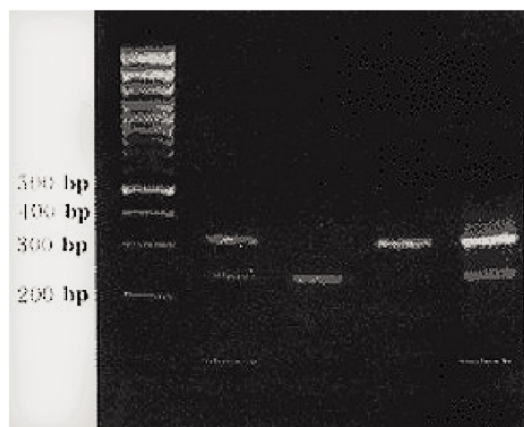


图 2 1、3、4 均于 317bp 处出现清晰条带

Fig.2 Clear bands with 317bp appeared in1, 3, 4

2.2 实验组胰岛素受体基因 C→T 多态性与胰岛素抵抗的关系

实验组伴胰岛素抵抗的患者有 31 例, 占总研究人数的 68.9%。胰岛素抵抗组患者出现胰岛素受体基因外显子 17 的 1058 位点 T 基因的频率为 51.6%, 非胰岛素抵抗组出现的频率为 42.8%, 胰岛素抵抗组与非胰岛素抵抗组中 INSR 基因外显子 17 出现 T、C 等位基因的频率比较无明显差别 $P>0.05$, 见表 4。

表 4 PCOS 患者胰岛素抵抗组与非胰岛素抵抗组胰岛素受体的基因多态性

Table 4 The gene polymorphisms of insulin receptor in the insulin resistance and non-insulin resistance groups of INSR

	Insulin resistance	Non-insulin resistance
Number of T	16 (51.6%)	6 (42.8%)
Number of C	15 (48.4%)	8 (57.1%)

2.3 实验组胰岛素受体基因 C→T 多态性与高雄激素血症的关系

按照空腹血清总睾酮 $\geq 50\text{ng/dl}$ 分为高雄激素血症组和无高雄激素血症组, 发现高雄激素血症组 T 等位基因出现的频率比无高雄激素血症的稍高, 但差别无统计学意义 ($P>0.05$), 提示胰岛素受体基因的多态性与高雄激素血症无明显关系, 表 5。

表 5 PCOS 患者高雄激素血症组与无高雄激素血症组胰岛素受体的基因多态性

Table 5 The gene polymorphisms of insulin receptor in the hyperandrogenemia and non-hyperandrogenemia groups of INSR

	Hyperandrogenemia	Non-hyperandrogenemia
Number of T	16 (61.5%)	11 (57.9%)
Number of C	10 (38.5%)	8 (42.1%)

3 讨论

多囊卵巢综合征(PCOS)被认为是一种育龄期妇女最常见的内分泌紊乱及代谢异常疾病, 以慢性持续不排卵、高雄激素血症及 B 超下的卵巢多囊样改变为主要特点, 影响了 5~8% 妇女的妊娠功能。患者从青春期的无排卵性月经开始, 到育龄期的受孕障碍, 再到中年时期 2 型糖尿病发病年龄的提前、子宫内膜癌的发病率增加, 期间或伴随多毛、痤疮、肥胖等代谢紊乱等表现, 病史可以贯穿一生。既往的研究表明 PCOS 是一种多基因遗传疾病, 有较强的家族聚集性^[10], 其高水平的雄激素如游离睾酮、总睾酮被认为是一种常染色体显性遗传^[12]。1980 年, Burghen 首次提出了胰岛素抵抗可能与 PCOS 的发病有关。国外有文献报道认为胰岛素受体基因的多态性与 PCOS 有关^[9]。这种多态性可能导致 PCOS 妇女的胰岛素抵抗的发展及代偿形成高胰岛素血症, 从而可以诱发高雄激素血症产生 PCOS。高胰岛素血症被认为是通过刺激卵巢分泌和肝脏合成 SHBG 产生更多的雄激素^[11]增加高雄激素水平加速 PCOS 的发病。

不同的 PCOS 子群中通过特定的基因变异呈现出特定的基因表型表达。基因多态性是指碱基替换、插入、切除等引起的 DNA 变异, 一般而言大多数的基因多态性发生在基因的非编码区即内含子上, 不会产生明显的作用, 但如果这种变异发生在外显子即基因的编码区, 这一位点就可能发生氨基酸的改变替换, 可能会导致蛋白功能和表现型的改变^[13]。本研究通过对胰岛素受体基因外显子 17 进行 PCR-SSCP 分析, 发现存在两种带型, 组成 3 种基因型, 通过测序, 发现胰岛素受体基因外显子 17 的 1058 位点发生了 CAC→CAT 的突变^[14]。3 种基因型分别为纯合子 C/C 型、纯合子 T/T 型、和杂合子 C/T 型。实验发现 PCOS 患者与正常人群相比, 发生此突变的几率明显增高, 具有统计学意义, 说明 T 等位基因是存在于 PCOS 患者体内的, 有可能是它的发病基因。同时, 其在非肥胖的患者中表达显著高于肥胖患者, 具有统计学意义, 说明这种突变在较瘦的患者中更具有意义。这种基因多态性揭示了胰岛素抵抗、PCOS 与肥胖之间的关系, 在本研究中, 这种多态性基因出现的频率比既往报道中的要高 71.2%, 考虑可能与样本含量较小产生的误差有关, 也有可能是环境因素的原因。实验结果与文献^[48,9]的研

究结果基本一致,均提示T等位基因的变异与PCOS患者的BMI显著相关。以往也有研究证实肥胖可以加重胰岛素抵抗,那么,PCOS的肥胖型患者与非肥胖型患者的胰岛素抵抗的发病机制是否相同呢?无论肥胖与否,PCOS患者体内均存在胰岛素抵抗,只是抵抗程度的不同^[15]。另有研究发现,50% PCOS患者胰岛素抵抗与酪氨酸自身磷酸化的减少和丝氨酸的增加有关^[16],这更强调了胰岛素抵抗在不同的PCOS患者中的分子机制的不同。而Morin^[17,18]等人也证实肥胖型与非肥胖型的PCOS患者胰岛素抵抗的发病机理不同,但关于两者的胰岛素抵抗的具体发病机制,还需要进一步的研究。T等位基因的高发与胰岛素抵抗状态和高雄激素血症的发生并无明显关系,或许这只是PCOS的其中一个发病原因,与其主要的病理状态并无直接关系。在我国PCOS患者中,胰岛素抵抗普遍存在,国外有报道证实,PCOS患者在胰岛素抵抗状态得到纠正的同时,其它的代谢异常和生殖方面的障碍也都得到了一定程度的恢复^[19,20]。如果我们可以通过基因研究发现一种与胰岛素抵抗相关的指标,并应用在临床检验,那么或许可以为PCOS患者胰岛素抵抗的早诊断,及时治疗,避免后期并发症的发生带来希望。

综上所述,本研究的结果表明:胰岛素受体基因外显子17中T/C单核苷酸多态性表现与PCOS患者的发病密切相关,T等位基因的高发频率与非肥胖型PCOS患者的发病密切相关;瘦型PCOS患者与肥胖型患者胰岛素抵抗的发病机制或许不同;T等位基因的高发频率与PCOS的主要临床表现如胰岛素抵抗、高雄激素血症并无明显相关关系。

参考文献(References)

- [1] Xu Xin-hua, Zhao Han, Shi Yu-hua. Family association study between INSR gene polymorphism and PCOS in han chinese[J]. Reproductive Biology and Endocrinology, 2011, 9: 76-78
- [2] Reis KS. et al. Anthropometric and metabolic evaluation of first-degree male relatives of women with polycystic ovary syndrome[J]. Rev Bras Ginecol Obstet, 2010, 32(7): 334-339
- [3] Li Jin, Zhu Xiao-ming, Luo Qiong, et al. A novel SNP at exon 17 of INSR is associated with decreased insulin sensitivity in chinese women with PCOS[J]. Molecular Human Reproduction, 2006, 12(3): 151-155
- [4] Srabani Mukherjee, Nuzhat Shaikh, Sushma Khavale. Genetic variation in exon 17 of INSR is associated with insulin resistance and hyperandrogenemia among lean India women with polycystic ovary syndrome[J]. European journal of Endocrinology, 2009, 160: 855-862
- [5] Lin Yun, Xing Fu-qi, Ou Zhi-ying, et al. Relation between insulin resistance and insulin receptor gene methylation in the endometrium of patients with polycystic ovary syndrome[J]. South Med J, 2011, 12(08): 67-70
- [6] Shen ZQ, Zhu HT, Lin JF. Reverse of progestin-resistant atypical endometrial hyperplasia by metformin and oral contraceptives[J]. Obstet Gynecol, 2008, 112(2): 465-467
- [7] 金丽, 黄荷凤, 金帆. 多囊卵巢综合征患者胰岛素受体 β -亚基表达及胰岛素受体基因外显子17多态性研究[J]. 中华妇产科杂志, 2005, 40(5): 323-326
- [8] 刘惠娜, 谭丽. PCOS患者中PPAR- γ 基因外显子6与INRS基因外显子17多态性的研究[D]. 郑州大学硕士论文, 2007-06-08
- [9] 石玉华, 陈子江. 中国人多囊卵巢综合征相关因素系列研究[D]. 《山东大学博士论文》-2004-04-08
- [10] Tugba Unsal, Ece Konac, Ediz Yesilkaya, et al. Genetic polymorphisms of FSHR, CYP17, CYP11A1, CAPN10, INSR, SERPINE1 genes in adolescent girls with polycystic ovary syndrome [J]. Assist Reprod Genet, 2009, 2(6): 205-216
- [11] 郑建淮, 曹簪孙, 陈晓燕, 等. 多囊卵巢综合症患者胰岛素抵抗与雄激素和糖代谢变化的关系 [J]. 西安交通大学学报, 2002, 23(6): 572-575
- [12] Ioannidis A, Ikonomi E, Dimou NL, et al. Polymorphisms of the insulin receptor and the insulin receptor substrates genes in polycystic ovary syndrome: a Mendelian randomization meta-analysis [J]. Mol Genet Metab, 2010, 99: 174-183
- [13] Vigil P, Contreras P, Alvarado JL, et al. Evidence of subpopulations with different levels of insulin resistance in women with polycystic ovary syndrome[J]. Human Reproduction, 2007, 11: 2974-2980
- [14] 李敏, 孙永玉. 多囊卵巢综合症胰岛素抵抗相关基因的实验研究[D]. 华中科技大学博士论文, 2004-04-01
- [15] Farrell K, Antoni MH. Insulin resistance, obesity, inflammation, and depression in polycystic ovary syndrome: bio behavioral mechanisms and interventions[J]. Fertil Steril, 2010, 9(4): 1565-1574
- [16] Deeks A, Gibson-Helm ME, Teede HJ. Anxiety and depression in polycystic ovary syndrome: a comprehensive investigation [J]. Fertil Steril, 2010, 9(3): 2421-2423
- [17] Morin-papunen L, Vauhkonen I, Koivunen R. Metformin versus ethinylestradiol-cyproterone acetate in the treatment of nonobese women with polycystic ovary syndrome: a randomized study [J]. Journal of clinical endocrinology and metabolism, 2003, 8(8): 148-156
- [18] Indhavivadhana S, Wongwananuruk T, Rattanachaiyanont M. Prevalence of metabolic syndrome in reproductive-aged polycystic ovary syndrome Thai women[J]. Med Assoc Thai, 2010, 9(3): 653-660
- [19] Ioannidis A, Ikonomi E, Dimou NL, et al. Polymorphisms of the insulin receptor and the insulin receptor substrates genes in polycystic ovary syndrome: a Mendelian randomization meta-analysis [J]. Mol Genet Metab, 2010, 99: 174-183
- [20] Alexandra Bargiota, Evanthia Diamanti-Kandarakis. The effects of old, new and emerging medicines on metabolic aberrations in PCOS [J]. Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism, 2012, 3(1): 27-47