

# 黄体生成素 亚基 Trp8Arg 和 Ile15Thr 突变 与多囊卵巢综合征

张二红<sup>1</sup>, 梁晓燕<sup>2</sup>, 曾海涛<sup>2</sup>, 杜 静<sup>2</sup>, 骆春启<sup>2</sup>, 庄广伦<sup>2</sup>

(中山大学 1. 附属第三医院不育与性医学科, 广东 广州 510630; 2. 附属第一医院生殖中心, 广东 广州 510080)

**摘要:** 【目的】探讨黄体生成素(luteinizing hormone, LH) 亚基 Trp8Arg 和 Ile15Thr 突变与中国人多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS) 的关系。【方法】采用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性分析(PCR-RFLP)技术检测113例PCOS患者和68例正常妇女,分析LH亚基基因突变与PCOS之间的关系。【结果】PCOS组血清LH、睾酮、游离睾酮及胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)均显著高于对照组( $P < 0.05$ )。在两组中均有亚基突变发现,Trp8Arg突变率在PCOS组16例(14.16%),对照组4例(5.88%);Ile15Thr突变率在PCOS组15例(13.27%),对照组4例(5.88%),突变频率在两组间没有统计学差异。两组中突变杂合子与非突变者性激素水平没有统计学差异。【结论】PCOS患者促性腺激素和性激素水平发生紊乱。PCOS组LH亚基Trp8Arg和Ile15Thr突变发生率高于正常对照组,但差异未有统计学意义。本研究未发现突变杂合子改变了LH的生物学功能。

关键词: 多囊卵巢综合征; 黄体生成素; 基因; 点突变

中图分类号: R711.51

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)01-0059-04

## Role of Trp8- Arg and Ile15- Thr Mutations in Human Luteinizing Hormone - subunit in Women with Polycystic Ovary Syndrome

ZHANG Er-hong<sup>1</sup>, LIANG Xiao-yan<sup>2</sup>, ZENG Hai-tao<sup>2</sup>, DU Jing<sup>2</sup>, LUO Chun-qi<sup>2</sup>, ZHUANG Guang-lun<sup>2</sup>

(1.Department of Infertility and Sexology, The Third Affiliated Hospital, 2.Reproductive Medical Center, The First Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

**Abstract:** 【Objective】To determine any association between the point mutation of Trp8Arg and Ile15Thr in the exons 2 of LH gene and the polycystic ovary syndrome (PCOS) in Chinese women. 【Method】A total of 113 PCOS patients and 68 normal ovulatory women with regular menstrual cycles were recruited. The presence of the mutations of the human LH - subunit was screened by polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). 【Result】The serum level of luteinizing hormone (LH), testosterone, free testosterone and HOMA- IR in PCOS group were higher than that in control group, which were statistically significant ( $P < 0.005$ ). The mutation rate of Trp8Arg detected in the PCOS group (16 cases) and control group (4 cases) were 14.16% and 5.88%, relatively, but the difference between the two groups was not statistically significant. The mutation rate of Ile15Thr detected in the PCOS group (15 cases) and control group (4 cases) were 13.27% and 5.88%, relatively. The difference of frequency of mutation was not significant also. There was also no difference found in hormonal levels between the heterozygous and wild type in PCOS group and control group. 【Conclusion】PCOS patients have disorders in their gonadotropin and sexual hormone levels. The frequency of the variant LH - subunit gene in the PCOS group was higher than that in the control group, but the difference was not significant. The presence of heterozygous of the variant did not alter the bioactivity of LH.

Key words: polycystic ovary syndrome; luteinizing hormone; gene; dot mutation

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2007, 28(1): 59- 62]

收稿日期: 2006-09-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30271367, 30300372); 广东省自然科学基金资助项目 (31690, 21874); 广州市科委资助项目 (2004J-C0111)

作者简介: 张二红 (1975-), 女, 安徽人, 硕士, 住院医师; 通讯作者: 梁晓燕, 教授, 博士生导师, E-mail: lxyzy@263.net

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)是临床常见的妇科内分泌疾病。近年来研究发现 PCOS 的发生有家族聚集性,认为 PCOS 主要以常染色体显性方式遗传,由遗传因素和环境因素共同造成<sup>[1,2]</sup>。黄体生成素(luteinizing hormone, LH)增高是 PCOS 患者常见内分泌改变之一。LH 基因突变有可能在 PCOS 的遗传学机制方面起作用。LH 基因 Trp8Arg 和 Ile15Thr 突变是国外学者研究较多的一种突变,其与 PCOS 的关系尚有争议。本文主要研究此突变与中国 PCOS 妇女发病的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

2004 年 5 月至 2005 年 3 月在中山大学附属第一医院生殖中心及妇产科门诊就诊的 PCOS 患者 113 例,诊断标准参考 2003 年 Rotterdam 标准<sup>[3]</sup>。68 例月经周期正常妇女作为对照。月经期第 2-5 天抽血测定基础性激素、空腹胰岛素、血糖等。闭经患者予黄体酮撤退来月经后抽血检测。测定身高体重并收集相关资料。

### 1.2 研究方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 抽取 EDTA 抗凝外周静脉血 2 mL, DNA 抽提按中山大学达安基因诊断中心 DNA 抽提试剂盒说明进行。

1.2.2 聚合酶链反应(PCR) 引物由上海博亚公司合成,序列为 LHF: 5'-GAA GCA GTG TCC TTG TCC CA-3'; LHR: 5'-GAA GAG GAG GCC TGA GAG TT-3'<sup>[4]</sup>, 扩增产物 660 bp。PCR 反应体系: 5 × buffer 10 μL、10 × dNTP 1 μL、引物各 0.5 μL、Taq 酶 1.5 μL、模板 DNA 2 μL、双蒸水加至 50 μL。93 °C 3 min 预变性, 93 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 进行 35 个循环, 72 °C 再延伸 7 min。

1.2.3 限制性片段长度多态性分析(RFLP) Nco I 内切酶、Fok I 内切酶购自 NEB 公司。两种酶切反应体系及反应条件一致。PCR 产物 10 μL、10 × buffer 2.5 μL、内切酶 2 μL、加水至 25 μL 以上物质混匀后置 37 °C 水浴, 消化 2 h。酶切产物进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后进行银染。

1.2.4 PCR 产物的回收纯化和序列测定 由上海博亚公司测序。

### 1.3 统计方法

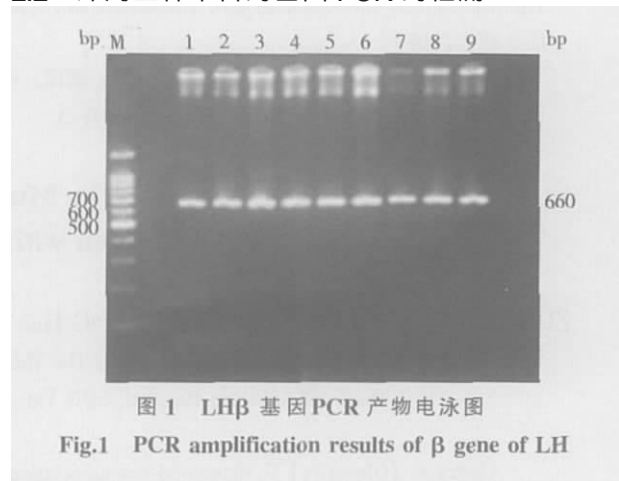
采用 SPSS 11.0 统计软件处理数据,各参数采用表示,各均数之间的比较用 t 检验。两组间基因突变频率的比较采用  $\chi^2$  检验及 Fisher's 精确概率检验。

## 2 结果

### 2.1 两组观察对象的内分泌特征及激素水平

PCOS 组与对照组年龄相匹配,基础 LH、睾酮(testosterone, T)、游离睾酮(free testosterone, free T)、HOMA-IR[胰岛素抵抗指数=空腹胰岛素(mIU/L) × 空腹血糖(mmol/L)/22.5]有统计学差异( $P < 0.05$ , 数据略),符合 PCOS 疾病特点。

### 2.2 外周血样本目的基因 PCR 的检测



### 2.3 限制性片段长度多态性分析结果

LH 亚单位 Trp8Arg 和 Ile15Thr 突变是第 2 外显子内存在 2 个不同位置的错义突变。限制性内切酶 Nco I 消化 PCR 产物,野生型(W-LH)显示 475 bp、100 bp 和 85 bp 电泳条带,Trp8Arg 突变纯合子显示 475 bp 和 185 bp 电泳条带,杂合子显示 475 bp、185 bp、100 bp 和 85 bp 电泳条带(图 2)。限制性内切酶 Fok I 消化 PCR 产物,W-LH 显示 390 bp、176 bp、51 bp 和 43 bp 电泳条带,Ile15Thr 突变纯合子显示 433 bp、176 bp 和 51 bp 电泳条带,突变杂合子显示 433 bp、390 bp、176 bp、51 bp 和 43 bp 电泳条带(图 3)。突变经测序证实,序列图见图 4。突变在两组中均有发现,通过检验,所调查人群基因型分布符合 Hardy-Weinberg 平衡 ( $P > 0.05$ )。Trp8Arg 突变和 Ile15Thr 突变的发生率在两组中比较无统计学差异( $P > 0.05$ ;表 1, 2)。

### 2.4 突变杂合子 PCR 产物测序图

表 1 两组 LH 亚基 Trp 和 Arg 突变基因型分布和频率  
Table 1 Genotype frequencies of Trp and Arg mutation of the human LH  $\beta$ -subunit in two groups

	n	Arg/Trp	Trp/Trp	<sup>2</sup>	P
PCOS	113	16(14.16%)	97(85.84%)		
Control	68	4(5.88%)	64(94.12%)		
Sum	181	20	161	2.95	0.09

表 2 两组 LH 亚基 Ile/Thr 突变基因型分布和频率  
Table 2 Genotype frequencies of the mutation Ile/Thr of the human LH  $\beta$ -subunit in two groups

	n	Ile/Thr	Ile/Ile	<sup>2</sup>	P
PCOS	113	15(13.27%)	98(86.73%)		
Control	68	4(5.88%)	64(94.12%)		
Sum	181	19	162	2.47	0.14

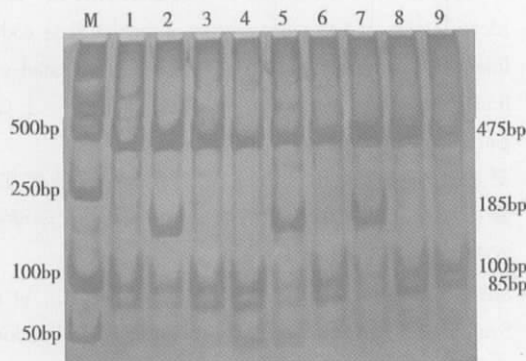


图 2 Nco I 酶切聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig.2 Schematic representation of Nco I restriction digestion products of the LH  $\beta$ -subunit amplified by PCR

M: DNA marker; Lane 1, 3, 4, 6, 8, 9: Wild type; Lane 2, 5, 7: heterozygotes

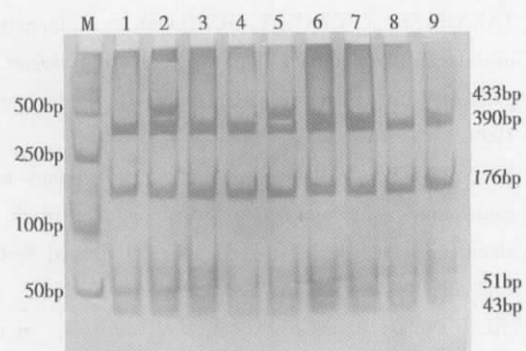


图 3 Fok I 酶切聚丙烯酰胺凝胶电泳图

Fig.3 Schematic representation of Fok I restriction digestion products of the LH  $\beta$ -subunit amplified by PCR

M: DNA marker; Lane 1, 3, 4, 6, 7, 8, 9: Wild type; Lane 2, 5: heterozygotes

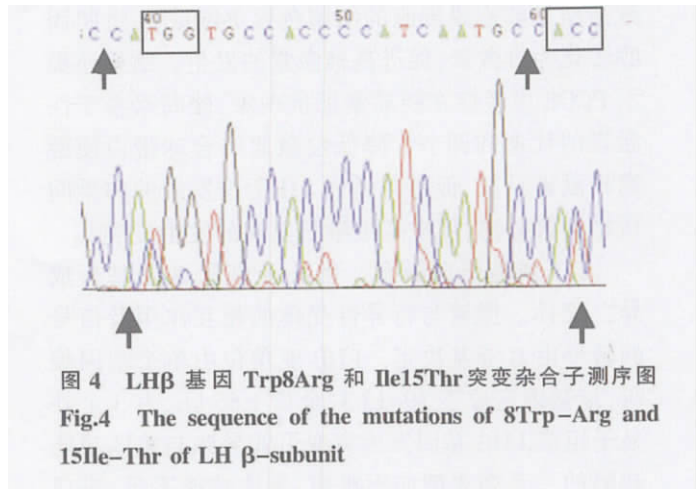


图 4 LH $\beta$  基因 Trp8Arg 和 Ile15Thr 突变杂合子测序图  
Fig.4 The sequence of the mutations of 8Trp-Arg and 15Ile-Thr of LH  $\beta$ -subunit

### 2.5 PCOS 组 LH 基因突变与主要临床代谢特点的关系

根据体质量指数 (Body mass index, BMI) 进行分类, 25 为肥胖组。在 PCOS 组及对照组中肥胖与非肥胖者 LHTrp8Arg 突变和 Ile15Thr 突变频率无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。比较了 PCOS 患者中 LH 基因突变携带者 (即突变型 v- LH) 与非突变携带者 (即野生型 w- LH) 之间的主要临床特点发现: 两组的年龄、平均体质量指数、基础性激素水平均无显著性差异 (表 3)。

表 3 PCOS 患者 基因突变携带者与非突变携带者的一般情况和内分泌特征

Table 3 Reproductive characteristic and hormone values in wild type and heterozygotes of PCOS

	W- LH (n=97)	V- LH (n=16)	t	P
Age	26.4 $\pm$ 4.5	26.2 $\pm$ 6.6	0.12	0.16
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	23 $\pm$ 3	23 $\pm$ 4	1.08	0.99
HOMA- IR	2.6 $\pm$ 1.9	2.5 $\pm$ 1.3	0.66	0.76
FSH (IU/L)	5.8 $\pm$ 1.7	6.3 $\pm$ 1.4	1.03	0.46
LH (IU/L)	16 $\pm$ 10	16 $\pm$ 5	0.17	0.43
PRL (ng/mL)	17 $\pm$ 8	16 $\pm$ 8	0.45	0.99
E2 (pmol/L)	284 $\pm$ 130	268 $\pm$ 83	0.48	0.63
T (nmol/L)	3.8 $\pm$ 1.2	3.5 $\pm$ 0.8	0.69	0.49
Free T (nmol/L)	27 $\pm$ 12	26 $\pm$ 14	0.01	0.95

### 3 讨论

生殖系统的正常发育和功能依赖于激素及因子间复杂的相互作用。本研究结果显示 PCOS 患者促性腺激素和性激素水平发生紊乱。经统计发现 PCOS 患者 LH、T 及游离 T 水平高于对照组。LH 能

激活卵巢卵泡膜细胞的细胞色素 P450c17, 将胆固醇转化为雄激素, 促进高雄激素的发生。结果还提示 PCOS 患者存在胰岛素抵抗现象, 胰岛素参予性激素的代谢和调节, 降低性激素结合球蛋白使游离雄激素升高, 促进并增强 LH 所诱发的卵巢间质雄激素分泌, 促进高雄激素血症的发生发展<sup>[5]</sup>。

LH 属糖蛋白激素, 由  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基形成异二聚体。激素与特异性受体的相互作用及信号的转导由  $\beta$  亚基决定。LH  $\beta$  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 基因发生突变可能导致与黄体功能缺陷的一系列表型如不排卵、黄体功能不足、未成熟卵泡排卵等, 机制可能是突变的 LH 不能与受体正常作用。既往研究表明 LH 基因 Trp8Arg 和 Ile15Thr 突变 15 位密码子 (ATC ACC) 突变增加了一个糖基化作用位点, 介导了 Asn 寡糖侧链, 新增的糖基化位点可能避免  $\beta$  亚基发生二硫键连接的自身聚合。形成硫化碳水化合物与肝脏的受体结合, 从而更快地从血中被清除, 与其半衰期缩短有关<sup>[6]</sup>。对重组 V-LH 表达蛋白研究表明密码子 8 (TGG CGG) 突变改变了 LH 分子结构及免疫反应性<sup>[7]</sup>, 造成许多常用的单克隆抗体不能检测出 LH 的真实水平, 对临床工作产生干扰。LH 基因 Trp8Arg 和 Ile15Thr 突变的病理生理意义至今尚不明确。推论突变可能与性腺的功能变化有关。

日本报道散发病例变异型纯合子 LH 妇女有复发性流产, 月经紊乱, 不孕及 PCOS。Takahashi 研究发现 LH 基因变异与妇女不育, 卵巢早衰有关<sup>[8]</sup>。对世界范围的这种基因突变携带者频率进行分析, 在不育及健康人群中均有发现, 突变基因携带率从 0 到 53.5% 不等。频率大范围的波动提示这种多样性在一定环境下对人类进化是有利的<sup>[9,10]</sup>。本研究中两种突变在月经周期正常妇女及 PCOS 组中均有发现, PCOS 组中频率高于正常对照组, 但差异未达到统计学意义。比较了 PCOS 患者中 LH 基因突变型与野生型之间的主要临床特点发现, 两组的年龄、平均体质量指数、基础性激素水平均无显著性差异; 对照组中 LH 基因突变型与野生型两组之间的年龄、平均体质量指数、基础性激素水平均无显著性差异 ( $P > 0.05$ , 数据略)。此次研究中没有发现突变的杂合子 PCOS 患者与非突变 PCOS 患者在雄激素水平的差异。因为没有纯合子, 本研究尚不能说明突变型 LH 的体内生物活性

变化情况。此突变与 PCOS 的关系尚需要进一步的研究阐明。

#### 参考文献:

- [1] LEGRO R S, STRAUSS J F. Molecular progress in infertility: polycystic ovary syndrome [J]. *Fertil Steril*, 2002, 78(3):569-576.
- [2] STRAUSS J F 3rd. Some new thoughts on the pathophysiology and genetics of polycystic ovary syndrome [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 997(11): 42-48.
- [3] The Rotterdam ESHRE / ASRM - Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnosis criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS) [J]. *Hum Reprod*, 2004, 19 (1): 41-47.
- [4] FURUI K, SUGANUMA N, TSUKAHARA S, et al. Identification of two point mutations in the gene coding luteinizing hormone (LH)  $\beta$ -subunit, associated with immunologically anomalous LH variants [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1994, 78(1):107-113.
- [5] 舒益民, 梁晓燕, 庄广伦, 等. 卵母细胞体外成熟在多囊卵巢综合征中的应用研究[J]. *中山医科大学学报*, 2001, 22(4):314-316.
- [6] MANNA P R, JOSHI L, PETERSSON K, et al. Synthesis, purification and structural and functional characterization of recombinant form of a common genetic variant of human luteinizing hormone [J]. *Hum Mol Genet*, 2002, 11(3): 301-315.
- [7] SUGANUMA N, FURUI K, FURUHASHI M, et al. Screening of the mutations in luteinizing hormone  $\beta$ -subunit in patients with menstrual disorders [J]. *Fertil Steril*, 1995, 63(5): 989-995.
- [8] TAKAHASHI K, OZAKI T, OKADA M, et al. Increased prevalence of luteinizing hormone  $\beta$ -subunit variant in patients with premature ovarian failure [J]. *Fertil Steril*, 1999, 71(1): 96-101.
- [9] HUHTANIEMI I. Mutations of gonadotrophin and gonadotrophin receptor genes: what do they teach us about reproductive physiology? [J]. *J Reprod Fertil*, 2000, 119(2):173-186.
- [10] NILSSON C, PETERSSON K, MILLAR R, et al. Worldwide frequency of a common genetic variant of luteinizing hormone: an international collaborative research. International Collaborative Research Group [J]. *Fertil Steril*, 1997, 67(6): 998-1004.

(编辑 张恩健)