

## ◇ 临床医学研究 ◇

**rs1333049 多态性与汉族人群多囊卵巢综合征的相关性研究**张 文<sup>1</sup>, 王彬彬<sup>2,3</sup>, 王 晶<sup>4</sup>, 陈蓓丽<sup>1</sup>, 徐玉萍<sup>1</sup>, 曹云霞<sup>1</sup>

**摘要** 目的 了解单核苷酸多态性位点 (SNP) rs1333049 与多囊卵巢综合征 (PCOS) 的关系。方法 采用以睾酮激素水平配对的患者作为对照者进行研究,对 139 例 PCOS 患者及 141 例对照者进行研究。采用实时荧光 PCR TaqMan 探针方法对 INK4 区域反义非编码 RNA (ANRIL) 的一个 SNPrs1333049 进行基因分型分析。结果 在 PCOS 患者中,各项生化指标和临床表现在各基因型之间差异无统计学意义。PCOS 患者和对照者间基因型分布和等位基因频率差异无统计学意义 ( $\chi^2 = 1.87, P = 0.17$ ;  $\chi^2 = 3.25, P = 0.20$ )。结论 染色体 9p21 上 rs1333049 多态性与 PCOS 高雄激素患者无关。

**关键词** 多囊卵巢综合征; ANRIL; rs1333049; 中国汉族

**中图分类号** R 588.6

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2014)05-0622-03

多囊卵巢综合征 (polycystic ovarian syndrome, PCOS) 是较为常见的内分泌系统紊乱的疾病,在育龄期妇女中发病率为 5% ~ 10%<sup>[1-2]</sup>。根据美国生殖医学协会/欧洲社会人类生殖和胚胎学会鹿特丹标准,PCOS 的诊断必须至少符合以下条件中的两个:① 稀发排卵或无排卵;② 高雄激素血症或高雄激素的临床表现(如多毛、痤疮等);③ 超声提示多囊卵巢<sup>[3]</sup>。在不同表型的 PCOS 患者中,雄激素过多都是心血管疾病的风险因素<sup>[4]</sup>。INK4 区域反义非编码 RNA (antisense non coding RNA in the INK4 locus, ANRIL) 位于染色体 9p21,且因其与心血管疾病发生的可疑作用而得到突显<sup>[5]</sup>。有研究<sup>[6]</sup>提示染色体 9p21 上某区域内存在有风险的单体型对于欧

洲人群的心血管疾病中起到重要作用,其中就包括了 rs1333049 这一单核苷酸多态性位点。该研究旨在评估染色体 9p21 上代表性多态性位点 rs1333049<sup>[7]</sup> 与中国汉族人群中患有多囊卵巢综合征的患者之间的相关性。

**1 材料与方法**

**1.1 研究对象** 选取 280 名妇女分为两组:PCOS 患者组及对照组。根据美国生殖医学协会/欧洲社会人类生殖和胚胎学会鹿特丹标准,共识诊断 PCOS 患者 139 例。诊断标准如下:① 月经稀少;黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) / 卵泡刺激素 (follicle stimulating hormone, FSH)  $\geq 2$ ; ② 高雄激素血症,血总睾酮 (Total testosterone, TT)  $> 2.8$  nmol/L; ③ 超声提示多囊卵巢。对照组 141 例女性有正常月经周期,正常的 FSH、LH、TT 生化检查结果,并且没有 PCOS 症状或任何其他类型的慢性无排卵疾病。患者来源于在医院生殖医学中心就诊的不孕症患者。本研究经医院伦理委员会批准,并获得患者知情同意及签署知情同意书。

**1.2 方法**

**1.2.1 一般资料的采集** 采用统一的调查问卷,了解研究对象的一般资料和临床资料,如年龄、月经史、婚育史等。

**1.2.2 生化指标的检测** 内分泌激素测定:抽血时间为早卵泡期即月经周期的第 5 ~ 7 天,闭经者无时间限制,取空腹静脉血用放射免疫法测定雌二醇 (estradiol,  $E_2$ )、孕激素 (progesterone, P)、睾酮 (testosterone, T)、FSH、LH、血清泌乳素 (plasma prolactin, PRL)。

**1.2.3 基因型分析** 基因序列信息来自 Hapmap 数据库。实时定量荧光 PCR 反应体系为 10  $\mu$ l,基因组 DNA 1  $\mu$ l, 5  $\mu$ l 2  $\times$  TaqMan Universal PCR Master Mix, 3.5  $\mu$ l 双蒸水和 0.5  $\mu$ l 20  $\times$  Assay Mix。反应条件为:60  $^{\circ}$ C 30 s, 95  $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 95  $^{\circ}$ C 10 s, 60  $^{\circ}$ C 1 min, 共 40 个循环。基因分型分为 GG、CG、CC 型。检测仪器为 StepOne PCR real time Sys-

2013-12-10 接收

基金项目:国家“973”项目(编号:2012CB944704);高等学校博士学科点专项科研基金(编号:20093420110001)

作者单位:<sup>1</sup> 安徽医科大学第一附属医院妇产科生殖中心,合肥 230022

<sup>2</sup> 国家人口计生委科研所遗传室,北京 100081

<sup>3</sup> 中国协和医科大学,北京 100730

<sup>4</sup> 首都医科大学医学遗传室,北京 100069

作者简介:张 文,女,硕士研究生;

曹云霞,女,主任医师,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: caoyunxia@126.com

tem (美国 ABI 公司) 分析软件为 SDS software 2.0 (美国 ABI 公司)。每个检测单元均设立阴性对照。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS 10.0 软件进行统计分析, PCOS 患者组和对照组间基因型和等位基因频率差异(计量资料)比较运用  $\chi^2$  检验, PCOS 患者组和对照组临床资料间(组间)差异运用  $t$  检验。

## 2 结果

**2.1 一般资料** PCOS 患者组和对照组 FSH 和 LH 水平比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。PCOS 患者组与对照组比较更具有发生心血管疾病风险因子, 如 T 水平和身体质量指数(body mass index, BMI)值( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 PCOS 患者组与对照组临床资料比较( $\bar{x} \pm s$ )

项目	患者( $n=139$ )	对照( $n=141$ )	$P$ 值
年龄(岁)	25.73 $\pm$ 3.8 (17~35)	29.79 $\pm$ 3.6(23~40)	<0.01
初潮年龄(岁)	15.0 $\pm$ 2.2	14.49 $\pm$ 1.3	0.23
BMI	23.00 $\pm$ 5.0	21.66 $\pm$ 2.9	<0.01
身高(cm)	160.0 $\pm$ 4.9	160.23 $\pm$ 5.2	0.15
体重(kg)	60.3 $\pm$ 13.0	55.55 $\pm$ 7.5	<0.01
E <sub>2</sub> (pmol/L)	257.99 $\pm$ 173.1	156.05 $\pm$ 75.9	<0.01
FSH(IU/L)	3.97 $\pm$ 1.2	6.90 $\pm$ 1.4	<0.01
LH(IU/L)	11.26 $\pm$ 3.26	5.56 $\pm$ 2.20	<0.01
PRL(ng/ml)	79.45 $\pm$ 53.5	21.69 $\pm$ 27.7	0.17
T(nmol/L)	3.47 $\pm$ 0.8	1.08 $\pm$ 0.6	<0.01

## 2.2 基因型分析

**2.2.1 TaqMan 探针基因分型图** 结果见图 1。

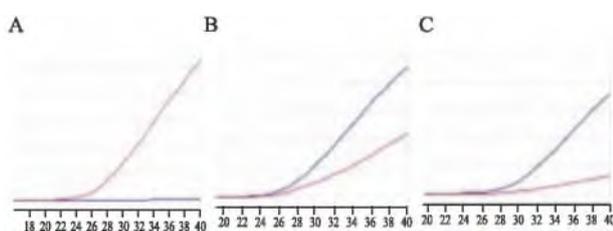


图 1 rs1333049 位点 3 种基因型的 TaqMan 探针结果  
A:CC;B:CG;C:GG

**2.2.2 基因型及等位基因频率** PCOS 患者组与对照组间基因型分布和等位基因频率差异无统计学意义( $\chi^2 = 1.87, P = 0.17; \chi^2 = 3.25, P = 0.20$ )。见表 2。

## 3 讨论

PCOS 不仅是一个生殖障碍疾病,同时也是一种可能长期影响妇女健康的代谢性疾病。根据鹿特

表 2 PCOS 患者组和对照组中 rs1333049 (C/G) 基因型和等位基因频率 [ $n$  (%) ]

组别	$n$	等位基因频率		基因型频率		
		C	G	CC	CG	GG
PCOS 患者	139	122(43.9)	156(56.1)	25(18.0)	72(51.8)	42(30.2)
对照	141	140(49.6)	142(50.4)	38(27.0)	64(45.4)	39(27.7)

OR(95% CI): 0.79(0.568-1.106)

丹标准 PCOS 表型得到扩展,包括有高雄激素表现的正常月经周期妇女和无雄激素过高的月经周期不规律的妇女。最近根据鹿特丹标准评估不同 PCOS 表型的内分泌指标,有高雄激素血症表现的所有表型都有腰围增加和胰岛素抵抗,而有多囊卵巢形态的无排卵非高雄激素血症的患者与对照比较却无此趋势。这就带来一个新的问题,这些新的 PCOS 表型是否存在代谢紊乱,甚至增加罹患糖尿病或心血管疾病的风险。同时,循环内的内源性雄激素在代谢改变,以及 PCOS 患者和健康女性体内的心血管系统中的作用仍不清楚。在部分同样的样本中检测出过早动脉粥样硬化升高的血清标志物,如 C 反应蛋白和同型半胱氨酸以及内皮功能障碍。PCOS 患者是早发心血管疾病高风险的最大群体<sup>[8]</sup>。近期文献<sup>[9]</sup>报道有增厚的颈动脉内膜厚度(intima-media thickness, IMT)的 PCOS 患者相较于健康对照者而言动脉粥样硬化倾向性明显增加,而 IMT 可通过无创检查对潜在的血管疾病进行评价。基于已知的心血管代谢的风险因子,PCOS 患者心血管疾病的风险较正常女性高出 5~7 倍<sup>[10]</sup>。

染色体 9p21 上这个区域含有编码 2 个细胞周期依赖激酶抑制因子—CDKN2A 和 CDKN2B 基因的编码序列。这两个基因在细胞周期调节中起重要作用,并且可能通过其在转化生长因子(TGF)- $\beta$  诱导生长抑制中的作用参与到动脉粥样硬化的病理过程中<sup>[11-12]</sup>。有报道<sup>[13]</sup>称染色体 9p21 上 ANRIL 参与到 CDKN2B-p16/CDKN2A-p14 细胞周期基因簇的调节。rs1333049 多态性是与疾病相关因子中联系最强的。有前期研究<sup>[7]</sup>证实 rs1333049 与多种心血管疾病之间存在相关性。然而,在 PCOS 患者组与对照组间 rs1333049 位点基因型分布与等位基因频率并无显著性差异;致使无法确定两者之间的联系。在心血管疾病病理发生过程中有多种风险因子参与,而在实验中 PCOS 患者的高 T 水平并不是心血管疾病发生的唯一病因。本研究收集病例均来自生育年龄妇女,而心血管疾病的发展则需要长时间的

过程,这有可能是另一个导致实验无法在 PCOS 和心血管疾病间建立联系的原因。尽管绝经后卵巢不能芳香化,但依然可以持续产生雄激素,所以绝经效应在循环内雄激素水平改变上并不是很明显。高雄激素血症在中年持续的程度可能决定有 PCOS 病史的老年妇女罹患心血管疾病的风险程度。

本研究是首次观察 rs1333049 在有高雄激素血症的 PCOS 患者身上发挥的作用。结果显示 rs1333049 多态性位点可能与中国汉族人群中 PCOS 患者无明显相关性。需要其他大样本例数的实验,以求进行更深入的研究,更真实地反映群体的情况。

### 参考文献

- [1] Franks S. Polycystic ovary syndrome [J]. *N Engl J Med*, 1995, 333(13): 853-61.
- [2] Azziz R, Woods K S, Reyna R, et al. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population [J]. *Clin Endocrinol Metab*, 2004, 89(6): 2745-9.
- [3] Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome [J]. *Fertil Steril*, 2004, 81(1): 19-25.
- [4] Lambroudakaki I. Cardiovascular risk in postmenopausal women with the polycystic ovary syndrome [J]. *Maturitas*, 2011, 68(1): 13-6.
- [5] Wellcome Trust Case Control Consortium. Genome-wide association study of 14 000 cases of seven common diseases and 3 000 shared controls [J]. *Nature*, 2007, 447(7145): 661-78.
- [6] Samani N J, Schunkert H. Chromosome 9p21 and cardiovascular disease: the story unfolds [J]. *Circ Cardiovasc Genet*, 2008, 1(2): 81-4.
- [7] Schunkert H, Götz A, Braund P, et al. Repeated replication and a prospective meta-analysis of the association between chromosome 9p21.3 and coronary artery disease [J]. *Circulation*, 2008, 117(13): 1675-84.
- [8] Sam S, Dunaif A. Polycystic ovary syndrome: syndrome XX [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2003, 14(8): 365-70.
- [9] Talbot E O, Guzick D S, Sutton-Tyrrell K, et al. Evidence for association between polycystic ovary syndrome and premature carotid atherosclerosis in middle-aged women [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2000, 20(11): 2414-21.
- [10] Dahlgren E, Janson P O, Johansson S, et al. Polycystic ovary syndrome and risk for myocardial infarction. Evaluated from a risk factor model based on a prospective population study of women [J]. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1992, 71(8): 599-604.
- [11] Zhou L, Zhang X, He M, et al. Associations between single nucleotide polymorphisms on chromosome 9p21 and risk of coronary heart disease in Chinese Han population [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2008, 28(11): 2085-9.
- [12] Lowe S W, Sherr C J. Tumor suppression by Ink4a-Arf: progress and puzzles [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2003, 13(1): 77-83.
- [13] Visel A, Zhu Y, May D, et al. Targeted deletion of the 9p21 non-coding coronary artery disease risk interval in mice [J]. *Nature*, 2010, 464(7287): 409-12.

## An association study of rs1333049 polymorphism with polycystic ovarian syndrome in Chinese Han population

Zhang Wen<sup>1</sup>, Wang Binbin<sup>2,3</sup>, Wang Jing<sup>4</sup>, et al

<sup>1</sup>Dept of Reproductive Medicine Center, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

<sup>2</sup>Center for Genetics, National Research Institute for Family Planning, Beijing 100081; <sup>3</sup>Peking Union Medical

College, Beijing 100730; <sup>4</sup>Dept of Medical Genetics, Capital Medical University, Beijing 100069)

**Abstract Objective** To investigate the association between rs1333049 polymorphism and the risk of polycystic ovarian syndrome(PCOS) in Chinese population. **Methods** 139 PCOS patients and 141 healthy control were divided in two groups by the level of testosterone. The TaqMan real time PCR technique was used to detect the genotypes of a single nucleotide polymorphism rs1333049 in ANRIL from the samples. **Results** In PCOS women, no significant differences in endocrine clinical and biochemical variables were found between the genotypes. There was no significant difference in genotype distributions and allele frequencies for rs1333049 between PCOS patients and controls. ( $\chi^2 = 1.87, P = 0.17$ ;  $\chi^2 = 3.25, P = 0.20$ ). **Conclusion** This study demonstrates no association of rs1333049 polymorphism locus on chromosome 9p21 with the risk for PCOS in Han Chinese.

**Key words** polycystic ovarian syndrome; ANRIL; rs1333049; Chinese Han population