

广西人群 LHCGR 基因位点 rs10495960 和 rs7579411 分布差异性研究

阙嘉妤¹, 庞晓霞¹, 覃莉¹, 李秀霞¹, 施桂玲², 王俊利¹

(1. 右江民族医学院附属医院生殖医学中心, 广西 百色 533000;

2. 右江民族医学院附属医院住培基地技能培训中心, 广西 百色 533000)

摘要:目的 研究人黄体生成素/人绒毛膜促性腺激素受体(LHCGR)基因 rs10495960 和 rs7579411 位点多态性在广西人群中的分布特征,比较不同种族人群的分布性差异。方法 本实验采用 DNA 测序法和多重单碱基延伸 PCR (SNaPshot),对 573 例右江民族医学院附属医院生殖中心门诊健康体检就诊者 LHCGR 基因的 rs10495960 和 rs7579411 位点基因型进行检测,与国际人类基因组单体型图计划(HapMap)公布的北京人群(HapMap-CHB)、日本人群(HapMap-JPT)、欧洲人群(HapMap-CEU)及非洲人群(HapMap-YRI)LHCGR 基因多态性数据进行比较。结果 广西人群中,rs10495960 位点包含 GG、GA、AA 基因型,以 G/A 基因型较常见(46.07%),等位基因以 G 较常见(64.05%);rs7579411 位点包含 CC、CT、TT 基因型,以 C/T 基因型较常见(47.12%),等位基因以 C 较常见(62.65%)。其中 rs10495960 位点各基因型和等位基因频率在男、女两组间分布差异都有统计学意义($P < 0.05$);rs7579411 位点各基因型和等位基因频率在男、女两组间分布差异均无统计学意义($P > 0.05$);广西地区人群 rs10495960 位点的基因型频率与 HapMap-JPT、HapMap-CEU、HapMap-YRI 比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),与 HapMap-CHB 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);rs10495960 位点的等位基因频率与 HapMap-CHB、HapMap-JPT、HapMap-CEU、HapMap-YRI 比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。广西地区人群 rs7579411 位点的基因型频率与 HapMap-JPT、HapMap-YRI 比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),与 HapMap-CHB、HapMap-CEU 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$);rs7579411 位点的等位基因频率与 HapMap-JPT、HapMap-YRI 比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),与 HapMap-CHB、HapMap-CEU 比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 广西人群中 LHCGR 基因的 rs10495960 位点多态性在男女中的分布存在差异性,rs10495960 和 rs7579411 位点多态性与其他种族间存在差异。

关键词:LHCGR; 基因多态性; 生殖疾病

中图分类号:R341 文献标识码:A 文章编号:1001-5817(2020)03-0281-05

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2020.03.004

A study on the distribution difference of LHCGR gene between loci rs10495960 and rs7579411 in Guangxi population

Que Jiayu¹, Pang Xiaoxia¹, Qin Li¹, Li Xiuxia¹, Shi Guilin², Wang Junli¹

(1. Reproductive Medicine Centre, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China; 2. Skills Training Center in the Resident Training Base, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To study the distribution characteristics of luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor (LHCGR) gene rs10495960 and rs7579411 loci polymorphisms in Guangxi population and compare the

基金项目:百色市科学研究与技术开发计划项目(百科 20182508)

第一作者简介:阙嘉妤(1992-),女,本科,住院医师,研究方向:生殖内分泌分子遗传学,E-mail:802886876@qq.com

通讯作者简介:施桂玲(1975-),女,本科,副主任医师,硕士研究生导师,研究方向:妇产科学,E-mail:328556316@qq.com

distribution differences among different ethnic groups. **Methods** In this study, DNA Sequencing method and Multiple Single-base Extended PCR (SNaPshot) were used to detect genotypes of LHCGR gene at the rs10495960 and rs7579411 loci in 573 patients who underwent out-patient physical examination at the Reproductive Center of Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, and the results were compared with the LHCGR gene polymorphism data of HapMap-CHB, HapMap-JPT, HapMap-CEU and HapMap-YRI published by the International HapMap Project (HapMap). **Results** In Guangxi population, rs10495960 loci contained genotypes of GG, GA and AA, among which G/A were more common (46.07%), and allele G was more common (64.05%); rs7579411 loci contained genotypes of CC, CT and TT, among which C/T were more common (47.12%), and allele C was more common (62.65%). The distribution differences in genotypes and alleles frequencies at rs10495960 loci between male and female group were all statistically significant ($P < 0.05$), while the distribution differences in genotypes and alleles frequencies at rs7579411 loci between male and female group were all not statistically significant ($P > 0.05$). When the genotype frequency at rs10495960 loci in Guangxi population was compared with those of HapMap-JPT, HapMap-CEU and HapMap-YRI, the differences were all statistically significant ($P < 0.05$), but the difference was not statistically significant when compared with HapMap-CHB ($P > 0.05$). When the allele frequency at rs10495960 loci in Guangxi population was compared with that of HapMap-CHB, HapMap-JPT, HapMap-CEU and HapMap-YRI, the differences were all statistically significant ($P < 0.05$). When the genotype frequency at rs7579411 loci in Guangxi population was compared with those of HapMap-JPT and HapMap-YRI, the differences were all statistically significant ($P < 0.05$), but the differences were not statistically significant when compared with HapMap-CHB and HapMap-CEU ($P > 0.05$). When the allele frequency at rs7579411 loci in Guangxi population was compared with those of HapMap-JPT and HapMap-YRI, the differences were all statistically significant ($P < 0.05$), but the differences were not statistically significant when compared with HapMap-CHB and HapMap-CEU ($P > 0.05$). **Conclusion** The polymorphism of LHCGR gene distribution at rs10495960 loci was different between males and females in Guangxi population. The polymorphism distribution at rs10495960 and rs7579411 loci was different from those of other races.

Key words: luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor; gene polymorphism; reproductive disease

人黄体生成素/人绒毛膜促性腺激素受体(LHCGR)基因属于 G 蛋白偶联受体家族,位于 2 号染色体的短臂上(2p21),参与正常生殖过程的多个环节,主要在性腺上表达,包括女性卵巢卵泡膜细胞、颗粒细胞、黄体 and 间质细胞以及男性睾丸间质细胞和脂肪细胞,尤其在激素调节、性分化、Leydig 细胞发育中起重要作用。有研究发现其与相关生殖疾病的发生发展密切相关^[1]。有研究表明,多囊卵巢综合征(PCOS)^[2]、Leydig 细胞发育不全(LCH)^[3]、家族性男性性早熟(FMPP)^[4]等生殖疾病与 LHCGR 多态性有关。本研究通过分析 LHCGR 基因多态性 rs10495960 和 rs7579411 两位点的基因型和等位基因频率在广西地区人群中的分布,并与 HapMap 数据库公布的 4 类人群(北京人群、日本人群、欧洲人群、非洲人群)的 LHCGR 基因多态性分型数据进行比较,探讨 LHCGR 基因多态性在不同地区人群中的分布差异,为深入研究 LHCGR 基因多态性与相关疾病的发病机制提供重要的遗传学理论依据和分子生物学基础。

1 资料和方法

1.1 研究对象 随机选取 2018 年 5 月—2019 年 5 月到右江民族医学院附属医院生殖中心门诊就诊的健康体检者 573 例,其中男 274 例,女 299 例,平均年龄(37.86 ± 12.41)岁。所有研究对象相互之间无亲缘关系,且都来自广西地区,排除心脑血管疾病、感染性疾病及肿瘤患者等。本研究已获得医院医学伦理委员会的批准。

1.2 方法

1.2.1 提取 DNA 采集研究对象 3 ml 静脉血,用乙二胺四乙酸二钾(EDTA K2)抗凝,样本 DNA 提取根据北京天根生化科技有限公司 DNA 提取试剂盒说明书进行,基因组 DNA 备用保存于 -20°C 冰箱。

1.2.2 制备引物 PCR 引物交由上海天昊生物科技有限公司设计合成。rs10495960 位点的上游引物序列为:GCCGTTCCCTAGGTGCTAA;下游引物序列为:CCCTGTTCTTCTCGGATCCTTTG;延伸引物为:TCTCTCGGGTCAATTCGTCCTTTTTG-GTCTCTGATTCTATTCCCGATGG; rs7579411 位

点上游引物序列为:CTCCAGTCTCCCCCTTGCTA-AAGA;下游引物序列为:TGAGATCTGAGAGAG TATGAGGGGTGAA;延伸引物序列为:TCTCTCG GGTCAATTCGTCCTT、AGATCTGAGAGAGTAT GAGGGGTGATCG。

1.2.3 基因测序 反应体系(10 μl)包含 ddH₂O 6 μl、纯化后多重 PCR 产物 2 μl、连接缓冲液 1 μl、5'连接引物混合液(1 μM)0.4 μl,3'连接引物混合液(2 μM)0.4 μl、高温连接酶 0.25 μl 混匀。PCR 反应条件为:94℃ 1 min,56℃ 4 min,38 个循环,4℃ 保存备用。取 0.5 μl 稀释后的连接产物,与 0.5 μl Liz500 SIZE STANDARD,9 μl Hi-Di 混匀,上 ABI3730XL 测序前 95℃ 变性 5 min,用 GeneMapper 4.1 分析测序结果。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件对实验结果进行统计学分析。采用直接计数法计算广西人群 LHCGR 基因 2 个位点的基因型和等位基因,用 Hardy-Weinberg 定律检验研究对象是否有代表性。用 χ^2 检验比较不同组间的分布差异, $P < 0.05$ 为差异有统计意义。

2 结果

2.1 基因型检测 LHCGR 基因 rs10495960 和 rs7579411 位点经 Hardy-Weinberg 平衡检验,两位点基因型 P 值(分别为 0.10 和 0.87)均 > 0.05 ,达 Hardy-Weinberg 平衡,表明本研究具有群体代表性。测序结果显示,在广西地区人群中,rs10495960 位点基因型为 GG、GA、AA,rs7579411 位点基因型为 CC、CT、TT。见图 1、图 2。

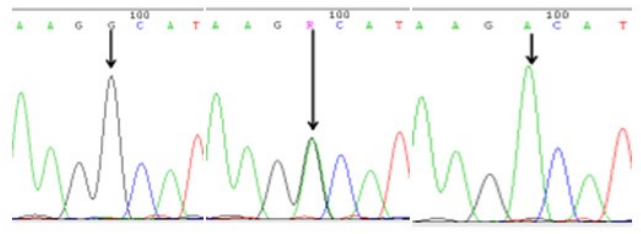


图 1 LHCGR 基因 rs10495960 测序图

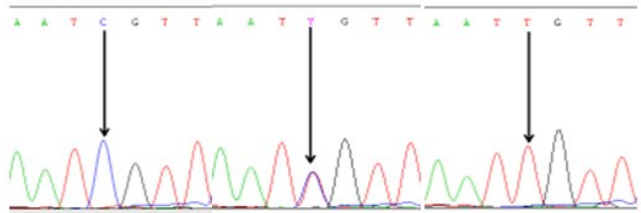


图 2 LHCGR 基因 rs7579411 测序图

2.2 LHCGR 基因 rs10495960 和 rs7579411 多态性在广西地区人群中的分布 统计分析表明,广西地区人群中,LHCGR 基因 rs10495960 和 rs7579411 位点分别以 GA/CT 基因型多见,其频率分别为 46.07% 和 47.12%,以 G 和 C 等位基因分布频率最高,各占 64.05% 和 62.65%。rs10495960 位点各基因型和等位基因频率在男、女两组间分布差异均有统计学意义 ($P < 0.05$);rs7579411 位点各基因型和等位基因频率在男、女两组间分布差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 1。

表 1 广西地区人群 LHCGR 基因 rs10495960(G/A)和 rs7579411(C/T)基因型及等位基因频率分布

项目	n	基因型			χ^2	P	等位基因型		χ^2	P
		AA/CC	GA/CT	GG/TT			A/C	G/T		
rs10495960(G/A)					7.158	0.028			5.490	0.019
男	274	25(9.12)	128(46.72)	121(44.16)			178(32.48)	370(67.52)		
女	299	49(16.39)	136(45.48)	114(38.13)			234(39.13)	364(60.87)		
总数	573	74(12.91)	264(46.07)	235(41.01)			412(35.95)	734(64.05)		
rs7579411(C/T)					0.043	0.979			0.007	0.935
男	274	107(39.05)	130(47.45)	37(13.50)			344(62.77)	204(37.23)		
女	299	117(39.13)	140(46.82)	42(14.05)			374(62.54)	224(37.46)		
总数	573	224(39.09)	270(47.12)	79(13.79)			718(62.65)	428(37.35)		

注:表内计数资料数据用[n(%)]表示。

2.3 LHCGR 基因 rs10495960 和 rs7579411 位点多态性在不同地区种族人群间的比较 如表 2 所示,广西地区人群 rs10495960 位点的基因型频率与 HapMap-JPT、HapMap-CEU、HapMap-YRI 相比差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),与 HapMap-CHB 相比,差异无统计学意义 ($P > 0.05$);广西地区人群

rs10495960 位点的等位基因频率与 HapMap-CHB、HapMap-JPT、HapMap-CEU、HapMap-YRI 相比差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

如表 3 所示,广西地区人群 rs7579411 位点的基因型频率与 HapMap-JPT、HapMap-YRI 相比差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),与 HapMap-CHB、Hap-

Map-CEU 相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); rs7579411 位点的等位基因频率与 HapMap-JPT、HapMap-YRI 相比差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),

与 HapMap-CHB、HapMap-CEU 相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表2 广西地区人群 rs10495960 位点多态性分布频率与 HapMap 公布的其他人群比较

人群	基因型			χ^2	P	等位基因型			χ^2	P	
	n	AA	GA			GG	n	A			G
广西人群	573	74(12.91)	264(46.07)	235(41.01)			1146	412(35.95)	734(64.05)		
北京人群	103	10(9.71)	44(42.72)	49(47.57)	1.832	0.440	206	142(68.93)	64(31.07)	78.531	<0.001
日本人群	104	6(5.77)	35(33.65)	63(60.58)	14.532	0.001	208	161(77.40)	47(22.60)	123.927	<0.001
欧洲人群	99	1(1.01)	32(32.32)	66(66.67)	26.746	<0.001	198	164(82.83)	34(17.17)	151.491	<0.001
非洲人群	108	—	—	108(100.00)	33.471	<0.001	216	216(100.00)	—	17.424	<0.001

注:①广西人群:Guangxi,北京人群:HapMap-CHB,日本人群:HapMap-JPT,欧洲人群:HapMap-CEU,非洲人群:HapMap-YRI;②表内计数资料数据用[n(%)]表示。

表3 广西地区人群 rs7579411 位点多态性分布频率与 HapMap 公布的其他人群比较

人群	基因型			χ^2	P	等位基因型			χ^2	P	
	n	AA	GA			GG	n	A			G
广西人群	573	224(39.09)	270(47.12)	79(13.79)			1146	718(62.65)	428(37.35)		
北京人群	41	20(48.78)	13(31.71)	8(19.51)	3.761	0.153	82	53(64.63)	29(35.37)	0.129	0.720
日本人群	72	12(16.67)	41(56.94)	19(26.39)	16.757	<0.001	144	65(45.14)	79(54.86)	16.449	<0.001
欧洲人群	113	34(30.09)	65(57.52)	14(12.39)	4.262	0.119	226	133(58.85)	93(41.15)	1.159	0.282
非洲人群	113	9(7.96)	47(41.59)	57(50.44)	91.519	<0.001	226	65(28.76)	161(71.24)	88.502	<0.001

注:①广西人群:Guangxi,北京人群:HapMap-CHB,日本人群:HapMap-JPT,欧洲人群:HapMap-CEU,非洲人群:HapMap-YRI;②表内计数资料数据用[n(%)]表示。

3 讨论

多囊卵巢综合征(polysystic ovary syndrome, PCOS)是常见的妇科内分泌疾病之一,最新的流行病学调查显示,在我国妇女中,PCOS 的患病率高达 5.6%^[5]。PCOS 临床主要表现为月经稀发或闭经、无排卵性不孕、肥胖及高雄激素血症,PCOS 患者发生 2 型糖尿病、代谢综合征、血脂异常、高血压及子宫内膜癌等疾病的风险增加,严重危害着广大女性的身心健康和生活质量。

LHCGR 基因对激素的识别和结合起着重要作用,参与 Leydig 细胞发育、激素调节、性分化,在生殖内分泌疾病的诊断和治疗中具有重要意义。LHCGR 基因在激素调节过程中是促排卵的关键,在 PCOS 患者的卵巢卵泡中被认为是过早表达的。有研究发现^[6],PCOS 患者血浆中伴有 LHCGR 表达水平明显升高,且 LHCGR 的高表达与胰岛素抵抗相关。全基因组关联分析(GWAS)提示 LHCGR 基因与汉族 PCOS 发病相关^[7],Mutharasan 等^[8]检测到欧洲血统妇女中 PCOS 与 LHCGR 基因两个位点 rs7562215、rs10495960 多态性的强烈关联。在瑞典和丹麦患者中^[9],LHCGR 基因中的两个位点 rs4597581 和 rs4953617 多态性与睾丸生殖细胞癌的风险有关。罗嘉

莉等^[10]用 Meta 分析发现 LHCGR 基因 rs13405728 多态性与 PCOS 的发生相关,但存在种族差异,在亚洲人群中 rs13405728 与 PCOS 的发病相关,在欧美人群中 rs13405728 与 PCOS 的发病无关联。LHCGR 基因多态性位点 rs13405728 的 TC+CC 基因型与新疆地区 PCOS 有相关性,可能是新疆地区 PCOS 的 2 个易感基因位点^[11]。PCOS 易感基因位点 LHCGR 在基因 rs13405728 位点单核苷酸多态性参与了肥胖型维族 PCOS 患者的发病^[12]。失活 LHCGR 基因突变可能是 46,XY 原发性闭经的常见原因^[13]。Zielen AC 等^[14]发现在一个巴基斯坦家族中,LHCGR 基因中的一个新的纯合子框架移位变异与原发卵巢功能不全有关。Lu Xuefeng 等^[15]的研究结果支持 LHCGR 的缺陷破坏排卵,但对受精和胚胎发育没有影响。由此可见 LHCGR 基因多态性与生殖内分泌疾病的研究较成熟广泛,但目前未见报道 LHCGR 基因位点 rs10495960 和 rs7579411 多态性在不同人群分布状况。

经本实验结果分析,广西地区人群中 LHCGR 基因 rs10495960 位点以 G/A 基因型较为常见(46.07%),等位基因以 G 较为常见(64.05%);rs7579411 位点则以 C/T 基因型为主(47.12%),等位

基因以 C 为主(62.65%)。其中 rs10495960 位点基因型频率及等位基因频率在男女中的分布差异均有统计学意义,提示广西地区人群中 rs10495960 位点多态性分布频率与性别有关联,男女之间存在分布的差异。另外,rs10495960 位点基因型频率、rs7579411 位点基因型频率及两位点的等位基因频率与 HapMap-JPT、HapMap-YRI 人群比较,分布差异均有统计学意义。这些结果表明,广西人群中存在 LHCGR 基因 rs10495960 和 rs7579411 位点的多态性,这些多态性与其他种族之间存在差异性。基因多态性可因自然选择、生活环境影响及种族不同等因素作用而存在很大差异,我们研究结果同样体现这个特性。基因多态性可影响蛋白的表达和功能的差异,使得不同种群或个体之间对某些疾病的发生发展存在不同的易感性,这也是疾病药物治疗存在个体间差异和耐药性的重要因素之一。因此,本研究有助于我们了解广西人群中 LHCGR 基因多态性的遗传背景,为今后深入研究 PCOS 与多态性关系提供数据支持。

参考文献:

- [1] 刘振腾,黄鑫,郝翠芳等. 黄体生成素/人绒毛膜促性腺激素受体基因在人类生殖过程和生殖疾病中的作用[J]. 生殖医学杂志,2013,22(9):722-726.
- [2] McAllister JM, Legro RS, Modi BP, et al. Functional genomics of PCOS: from GWAS to molecular mechanisms [J]. Trends Endocrinol Metab, 2015, 26(3):118-124.
- [3] Vezzoli V, Duminuco P, Vottero A, et al. A new variant in signal peptide of the human luteinizing hormone receptor (LHCGR) affects receptor biogenesis causing leydig cell hypoplasia[J]. Human molecular genetics, 2015, 24(21): 6003-6012.
- [4] Fujieda K, Ito Y. Inactivating and activating mutations of the human LH/hCG receptor leading to male pseudohermaphroditism and familial male-limited precocious puberty[J]. Nihon Rinsho, 2002, 60(2):265-271.
- [5] Li R, Zhang Q, Yang D, et al. Prevalence of polycystic ovary syndrome in women in China: a large community-based study[J]. Hum Reprod, 2013, 28(9):2562-2569.
- [6] Jones MR, Brower MA, Xu N, et al. Systems Genetics Re-

veals the Functional Context of PCOS Loci and Identifies Genetic and Molecular Mechanisms of Disease Heterogeneity[J]. PLoS genetics, 2015, 11(8):e1005455.

- [7] Chen ZJ, Zhao H, He L, et al. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for polycystic ovary syndrome on chromosome 2p16.3, 2p21 and 9q33.3[J]. Nat Genet, 2011, 43(1):55-59.
- [8] Mutharasan P, Galdones E, Peñalver Bernabé B, et al. Evidence for chromosome 2p16.3 polycystic ovary syndrome susceptibility locus in affected women of European ancestry[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2013, 98(1):E185-E190.
- [9] Brokken LJ, Lundberg-Giwercman Y, Rajpert De-Meyts E, et al. Association of polymorphisms in genes encoding hormone receptors ESR1, ESR2 and LHCGR with the risk and clinical features of testicular germ cell cancer [J]. Mol Cell Endocrinol, 2012, 351(2):279-285.
- [10] 罗嘉莉. LHCGR 基因、THADA 基因、DENND1A 基因多态性与多囊卵巢综合征相关性的 Meta 分析[D]. 南京:东南大学, 2016.
- [11] 黄玉红, 丁剑冰, 李霞, 等. LHCGR 基因、THADA 基因、DENND1A 基因单核苷酸多态性与新疆地区多囊卵巢综合征的关联性研究[J]. 新疆医科大学学报, 2016, 39(8):997-1003.
- [12] 李霞, 田海清, 张萌, 等. LHCGR 基因多态性与肥胖型维族 PCOS 糖代谢异常的关联性研究[J]. 新疆医学, 2019, 49(4):325-328.
- [13] Ben Hadj Hmida I, Mougou-Zerelli S, Hadded A, et al. Novel homozygous nonsense mutations in the luteinizing hormone receptor (LHCGR) gene associated with 46, XY primary amenorrhea [J]. Fertility and Sterility, 2016, 106(1):225-229.
- [14] Zielen AC, Khan MJ, Pollock N, et al. A novel homozygous frame-shift variant in the LHCGR gene is associated with primary ovarian insufficiency in a Pakistani family. [J]. Clinical genetics, 2018, 94(3-4):396-397.
- [15] Lu X, Yan Z, Cai R, et al. Pregnancy and live birth in women with pathogenic LHCGR variants using their own oocytes [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2019, 104(12):5877-5892.

收稿日期:2020-02-17;修回日期:2020-03-07