

• 论 著 •

新疆维吾尔族多囊卵巢综合征患者 CYP17 基因多态性与高雄激素血症的相关性分析*

王文玲, 郭敏, 马洁, 张彩荣

(新疆维吾尔自治区人民医院妇产科研究室, 新疆乌鲁木齐 830001)

摘要:目的 研究新疆维吾尔族多囊卵巢综合征(PCOS)患者 CYP17 基因多态性与高雄激素血症(HA)的相关性。方法 选取 59 例维吾尔族 PCOS 患者作为维吾尔族 PCOS 组,并将其分为维吾尔族 PCOS 伴 HA 组和维吾尔族 PCOS 不伴 HA 组,同时选取 18 例汉族 PCOS 伴 HA 患者作为汉族 PCOS 组。应用聚合酶链式反应-限制性片段长度多态性法检测 CYP17 启动子区域的碱基多态性,并且分析该碱基位点多态性与维吾尔族 PCOS 伴 HA 的相关性。结果 维吾尔族 PCOS 伴 HA 组 TT、TC、CC 基因型及 T、C 等位基因频率与维吾尔族 PCOS 不伴 HA 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);维吾尔族 PCOS 伴 HA 组中 TT、TC、CC 基因型及 T、C 等位基因频率与汉族 PCOS 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。维吾尔族 PCOS 伴 HA 组 TT、TC、CC 基因型患者血清睾酮水平明显高于维吾尔族 PCOS 不伴 HA 组,差异有统计学意义($P<0.05$);维吾尔族 PCOS 组 TC、CC 基因型患者血清睾酮水平与 TT 基因型患者比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 CYP17 各基因型分布频率均未增加维吾尔族妇女患 HA 的风险,CYP17 基因启动子区域的单核苷酸多态性与维吾尔族 PCOS 伴 HA 的发生无明显相关性。

关键词:多囊卵巢综合征; CYP17 多态性; 高雄激素血症

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.22.014

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)22-3109-04

Analysis on correlation between CYP17 gene polymorphism and hyperandrogenemia in Xinjiang Uyghur patients with polycystic ovary syndrome*

WANG Wenling, GUO Ming, MA Jie, ZHANG Cairong

(Gynecology and Obstetrics Research Institute, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Xinjiang 830001, China)

Abstract: Objective To investigate the correlation between the CYP17 gene polymorphisms and hyperandrogenemia(HA) in Uygur women patients with polycystic ovary syndrome(PCOS). **Methods** 59 Uygur patients with PCOS were selected as the Uygur PCOS group and re-divided into the Uygur PCOS complicating HA group and Uygur PCOS non-complicating HA group. Meanwhile 18 Han patients with PCOS complicating HA were selected as the Han PCOS group. The polymerase chain reaction-restrictive fragment length polymorphism method was used to examine the basic group polymorphisms in the promoter region of CYP17 gene. Then the correlation between basic group locus polymorphism and Uygur PCOS complicating HA was analyzed. **Results** There was no statistically significant difference between TT, TC and CC genotypes and T, C allele frequencies in the Uygur PCOS non-complicating HA group and Uygur PCOS complicating HA group ($P>0.05$). There was no statistically significant difference between TT, TC and CC genotypes and T, C allele frequencies in the Uygur PCOS complicating HA group and Han PCOS group ($P>0.05$). The serum testosterone level in TT, TC and CC genotypes patients of the Uygur PCOS complicating HA group was significantly higher than that in the Uygur PCOS non-complicating HA group ($P<0.05$). Serum testosterone level had no statistically significant difference between TC, CC genotypes and TT genotype patients of Uygur PCOS group ($P>0.05$). **Conclusion** The distribution frequency of CYP17 genotypes does not increase the risk suffering from HA in Uygur women. Single nucleotide polymorphism in CYP17 gene promoter region had no obvious correlation with Uygur PCOS complicating HA occurrence.

Key words: polycystic ovarian syndrome; CYP17 polymorphism; hyperandrogenemia

多囊卵巢综合征(PCOS)是一种会引起育龄期女性不孕的常见妇科内分泌疾病,其临床表型具有高度异质性,高雄激素血症(HA)、排卵障碍、卵巢多囊样改变为其主要特征。PCOS 的病因尚不明确,其家族聚集性提示遗传因素在 PCOS 的发病机制中起重要作用,CYP17 基因是研究 PCOS 病因的候选基因之一。Wickenheisser 等^[1]研究表明,CYP17 基因上游启动子区的 T→C 突变能够影响 PCOS 的表现型。Budi 等^[2]对印尼 45 位 PCOS 伴 HA 患者的研究发现,T→C 突变与 HA 密切相关,CC 和 TC 基因型患者发生 HA 的比例高于野生型 TT

患者。国内关于 CYP17 基因-34 bp 处多态性与 PCOS 伴 HA 关系的研究报道仅限于汉族人群,而关于维吾尔族 PCOS 伴 HA 的研究却鲜有报道。由于 PCOS 存在种族差异性,因此本研究以维吾尔族 PCOS 伴 HA 患者为研究对象,旨在探讨 CYP17 基因多态性与维吾尔族 PCOS 伴 HA 患者的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取自 2015 年 5 月至 2016 年 5 月本院妇产科门诊就诊的维吾尔族 PCOS 患者 59 例作为维吾尔族 PCOS 组,其中 PCOS 伴 HA 患者 17 例(维吾尔族 PCOS 伴 HA 组),

* 基金项目:新疆维吾尔自治区人民医院院内基金资助项目(20140131)。

作者简介:王文玲,女,助理研究员,主要从事妇科内分泌代谢病临床研究。

平均年龄(23.88±6.32)岁,PCOS 不伴 HA 患者 42 例(维吾尔族 PCOS 不伴 HA 组),平均年龄(25.34±4.71)岁。另外选取 18 例汉族 PCOS 伴 HA 患者作为汉族 PCOS 组,平均年龄(22.72±4.47)岁。PCOS 诊断标准依据 2003 年 ESHRE/ASRM 标准^[3]:(1)稀发排卵或无排卵;(2)高雄激素的临床表现和(或)HA;(3)卵巢多囊性改变,一侧或双侧卵巢直径 2~9 mm,卵泡数目不低于 12 个和(或)卵巢体积不低于 10 mL。符合上述 3 项中任何 2 项者,即可诊断为 PCOS。HA 诊断标准:按照 Ferriman-Gallway 评价标准对患者进行体毛分布评分,评分不低于 6 分或者血清总睾酮不低于 0.75 ng/mL^[4]。入选标

准:按上述诊断标准确诊的 PCOS 患者和 HA 患者;所有患者于就诊前 3 个月内未服用其他激素药物。排除标准:先天性肾上腺皮质增生症患者;库欣综合征患者;分泌雄激素的肿瘤患者;高催乳素症患者。维吾尔族 PCOS 伴 HA 组年龄、促黄体生成素(LH)、促卵泡生成素(FSH)、LH/FSH 与维吾尔族 PCOS 不伴 HA 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性;维吾尔族 PCOS 伴 HA 组年龄、LH、FSH、LH/FSH 与汉族 PCOS 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。见表 1、2。

表 1 维吾尔族 PCOS 组基本资料比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	年龄(岁)	LH(mIU/mL)	FSH(mIU/mL)	LH/FSH	睾酮(ng/mL)
维吾尔族 PCOS 伴 HA 组	17	23.88±6.32	11.21±5.66	5.86±1.56	2.05±1.09	1.62±1.26
维吾尔族 PCOS 不伴 HA 组	42	25.34±4.71	8.36±6.65	6.81±6.08	1.62±1.77	0.54±0.35
<i>t</i>		-0.956	1.519	-0.614	0.908	3.488
<i>P</i>		0.343	0.134	0.542	0.368	0.003

表 2 维吾尔族 PCOS 伴 HA 组和汉族 PCOS 组基本资料比较($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	年龄(岁)	LH(mIU/mL)	FSH(mIU/mL)	LH/FSH	睾酮(ng/mL)
维吾尔族 PCOS 伴 HA 组	17	23.88±6.32	11.21±5.66	5.86±1.56	2.05±1.09	1.62±1.26
汉族 PCOS 组	18	22.72±4.47	16.17±13.16	6.85±2.93	2.14±0.88	0.64±0.64
<i>t</i>		0.619	-1.395	-1.233	0.304	2.862
<i>P</i>		0.54	0.173	0.227	0.808	0.009

1.2 试剂与仪器 C1000™ Thermal Cycler PCR 扩增仪、凝胶成像仪均购自美国 Bio-Rad 公司, EPS 2A200 电泳仪购自美国 Amersham Biosciences 公司,人外周血 DNA 提取试剂盒购自美国 Promega 公司和北京全式金公司,限制性内切酶 MspA1 I 购自美国 Promega 公司,引物合成由上海生工生物技术有限公司完成。

1.3 方法

1.3.1 激素水平测定 于月经周期第 2~3 天(闭经 3 个月及以上者无月经周期限制)空腹采集肘静脉血,采用化学发光法测定血清睾酮水平。

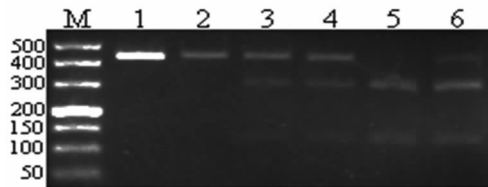
1.3.2 聚合酶链反应(PCR)扩增 采用 Promega 公司 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA。引物:上游 5'-CAT TCG CAC TCT GGA GTC-3',下游 5'-AGG CTC TTG GGG TAC TTG-3'。PCR 反应总体系 25 μL, DNA 模板 2 μL、MIX(包含 dNTPs、Taq 聚合酶、MgCl₂ 等)12.5 μL、上下游引物各 0.5 μL、灭菌双蒸水 9.5 μL。PCR 扩增条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,57 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,33 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min。扩增产物大小为 419 bp。

1.3.3 CYP17 基因多态性检测 应用 PCR-限制性片段长度多态性法进行检测。限制性内切酶 MspA1 I 酶切 PCR 扩增产物,酶切体系:总体积 20 μL,PCR 扩增产物 1 μL(1 μg/μL),10×缓冲液 2 μL,乙酰基 BSA 0.2 μL,限制性内切酶 0.5 μL,加超纯水补至 20 μL,混匀后置于 37 °C 恒温水浴槽酶切 4 h。全部酶切产物于含溴化乙锭的 2%琼脂糖凝胶上电泳,电压 180 V,电流 175 mA,紫外凝胶成像仪下观察。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计学处理。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,性激素水平比较采用 *t* 检验。CYP17 基因分型结果比较采用 χ^2 检验。利用 Hardy-Weinberg 平衡检验确认研究样本的群体代表性,采用非条件 Logistic 回归分析方法分析基因型多态性与维吾尔族 PCOS 的相关性。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

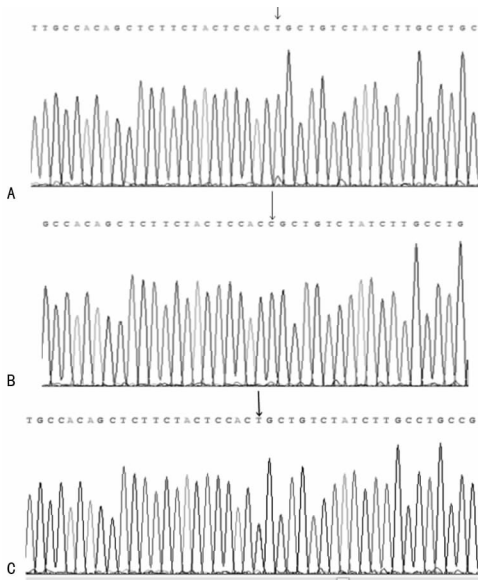
2.1 CYP17 基因 MspA1 酶切位点基因多态性比较 CYP17 基因-34 bp 处无 T→C 碱基置换时,酶切产物为 419 bp,基因型为 TT;CYP17 基因-34 bp 处存在 T→C 碱基置换时,酶切产物分别为纯合子 295、124 bp 片断和杂合子 419、295、124 bp 片断,基因型分别为 CC、TC。见图 1。



注:M为 DL500 DNA 分子标记物;1、2 基因型为 TT;3、4 基因型为 TC;5、6 基因型为 CC。

图 1 CYP17 基因 MspA1 I 酶切后基因分型

2.2 PCR 产物测序鉴定结果 碱基的突变与酶切结果一致,TT 型无碱基突变,CC 型存在等位基因 T→C 碱基置换,TC 型为杂合子。见图 2。



注:A为TT型,B为CC型,C为TC型。

图 2 CYP17 基因 PCR 扩增产物测序结果

2.3 各组 CYP17 基因型频率分布比较 维吾尔族 PCOS 不伴 HA 组 TT、TC、CC 基因型及 T、C 等位基因频率与维吾尔族 PCOS 伴 HA 组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$);汉族 PCOS 组 TT、TC、CC 基因型及 T、C 等位基因频率与维吾尔族 PCOS 伴 HA 组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3、4。

2.4 CYP17 各基因型间血清 T 水平比较 维吾尔族 PCOS 伴 HA 组中,TT、TC、CC 基因型患者血清睾酮水平分别为 (1.48 ± 0.83) 、 (2.17 ± 1.26) 、 (1.35 ± 0.87) ng/mL;维吾尔族 PCOS 不伴 HA 组中,TT、TC、CC 基因型患者血清睾酮水平分别为 (0.51 ± 0.37) 、 (0.58 ± 0.34) 、 (0.40 ± 0.39) ng/mL。两组 TT、TC、CC 基因型患者血清睾酮水平比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);两组内,TC、CC 基因型患者血清睾酮水平与 TT 基因型患者比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.5 各组 Hardy-Weinberg 平衡检测结果 维吾尔族 PCOS 伴 HA 组、维吾尔族 PCOS 不伴 HA 组和汉族 PCOS 组 CYP17 基因型频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡定律 (P 值分别为 0.478、0.784、0.984)。见表 5。

表 3 维吾尔族 PCOS 不伴 HA 组、维吾尔族 PCOS 伴 HA 组 CYP17 基因型频率分布 [$n(\%)$]

组别	基因型			等位基因	
	TT	CC	TC	T	C
维吾尔族 PCOS 不伴 HA 组	9(21.4)	7(16.7)	26(61.9)	44(52.4)	40(47.6)
维吾尔族 PCOS 伴 HA 组	3(17.6)	3(17.6)	11(64.7)	17(50.0)	17(50.0)
χ^2		0.107		0.055	
P		0.948		0.487	

表 4 汉族 PCOS 组、维吾尔族 PCOS 伴 HA 组 CYP17 基因型频率分布 [$n(\%)$]

组别	基因型			等位基因	
	TT	CC	TC	T	C
汉族 PCOS 组	3(16.7)	7(38.9)	8(44.4)	14(38.9)	22(61.1)
维吾尔族 PCOS 伴 HA 组	3(17.6)	3(17.6)	11(64.7)	17(50.0)	17(50.0)
χ^2		2.047		0.875	
P		0.359		0.244	

表 5 各组 Hardy-Weinberg 平衡检测结果 [$n(\%)$]

组别	参数	TT	CC	TC	χ^2	P
维吾尔族 PCOS 伴 HA 组	实际频数	9(21.4)	7(16.7)	26(61.9)	1.478	0.478
	理论频数	11.5(27.5)	9.5(22.7)	21(49.8)		
维吾尔族 PCOS 不伴 HA 组	实际频数	3(17.6)	3(17.6)	11(64.7)	0.486	0.784
	理论频数	4.25(25.0)	4.25(25.0)	8.5(50.0)		
汉族 PCOS 组	实际频数	3(0.17)	7(0.39)	8(0.44)	0.032	0.984
	理论频数	2.7(0.15)	6.7(0.37)	8.6(0.48)		

3 讨论

PCOS 高度的家族聚集性表明其受遗传因素的影响。CYP17 基因编码的 17 α 羟化酶/17、20 裂解酶可以催化孕烯醇酮和孕酮分别转化为 17-羟孕烯醇酮和 17-羟孕酮,这两种类

固醇进而转化为脱氢表雄酮和雄烯二酮。有研究表明,CYP17 基因-34 bp 处出现 T→C 碱基替换,使得 CYP17 基因转录增加,从而引起 HA^[5]。Li 等^[6]对 318 名中国汉族女性的研究发现,虽然 CYP17 位点的多态性与 PCOS 的发生没有直接的相

关性,但是会影响 PCOS 患者的血清睾酮和胰岛素抵抗水平。姚满红等^[7]对国内外的相关研究进行了 Meta 分析,结果表明 CYP17 基因-34 bp 位点 CC 基因型增加了 PCOS 的易感性。目前国内外研究报道比较一致地认为,CYP17 基因-34 bp 处 T→C 碱基置换并不是引起 PCOS 发病的原因;但关于 CYP17 位点的多态性是否增加 PCOS 的易感性,是否与 HA 有关的研究一直存在较大的分歧。国内关于此位点的研究都仅限于汉族女性,而 PCOS 在不同的地域和不同的种族间有不同的临床表现^[8]。与汉族女性相比,维吾尔族 PCOS 患者以 HA 为主要表型^[9],因此本研究选取 CYP17 作为目的基因,研究其对新疆维吾尔族 PCOS 伴 HA 患者有无易感性。

本研究结果显示:维吾尔族 PCOS 不伴 HA 组 TT、TC、CC 基因型及 T、C 等位基因频率与维吾尔族 PCOS 伴 HA 组中比较,差异无统计学意义($P>0.05$);汉族 PCOS 组 TT、TC、CC 基因型及 T、C 等位基因频率与维吾尔族 PCOS 伴 HA 组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);维吾尔族 PCOS 不伴 HA 组、维吾尔族 PCOS 伴 HA 组、汉族 PCOS 组中等位基因 T 和 C 的基因频率分别是 52.4%和 47.6%,50.0%和 50.0%,38.9%和 61.1%。这表明无论是汉族 PCOS 伴 HA 患者还是维吾尔族 PCOS 伴 HA 患者都倾向于含有较高比例的 C 等位基因。本研究发现:汉族 PCOS 伴 HA 患者中,TC 基因型最多,CC 次之,TT 最少;而维吾尔族 PCOS 伴 HA 患者中,TC 基因型最多,TT 和 CC 基因型数量相同。此差异有可能是由于种族之间存在差别,也有可能是由于本研究标本量有限。

有研究发现,PCOS 患者 CC 基因型血清睾酮水平高于 TC、TT 基因型,提示 CYP17 基因-34 bp 处 T→C 碱基置换引起该基因的表达异常和 P450c17- β 酶活性增加,进而导致 PCOS 伴 HA 的形成^[10-11]。本研究结果显示:维吾尔族 PCOS 伴 HA 组中 TT、TC、CC 基因型患者血清睾酮水平明显高于维吾尔族 PCOS 不伴 HA 组,差异有统计学意义($P<0.05$);维吾尔族 PCOS 组中,TC、CC 基因型患者血清 T 水平与 TT 基因型患者比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。这与上述研究结果相矛盾,但与 Li 和丁玲玲等^[6,12]的研究结果一致。

综上所述,在维吾尔族妇女中,CYP17 基因-34 bp 处 T→C 碱基置换为一常见多态,可能不是 PCOS 的致病原因,等位基因 C 虽然有较高的频率,但 CC 基因型未增加维吾尔族妇女患 HA 的风险。CYP17 基因启动子区域的单核苷酸多态性与维吾尔族 PCOS 伴 HA 的发生无明显相关性。

参考文献

[1] Wickenheisser JK, Nelson-Degrave VL, Mcallister JM. Dysregulation of cytochrome P450 17alpha-hydroxylase

messenger ribonucleic acid stability in theca cells isolated from women with polycystic ovary syndrome[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90(3): 1720-1727.

- [2] Budi W, Evi A, Dwi A, et al. Relation between CYP17 polymorphism and hyperandrogenemia in polycystic ovarian syndrome[J]. Indones J Obstet Gynecol, 2011, 35(1): 1-7.
- [3] Chang J, Azziz R, Legro R, et al. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Work shop Group (2004) Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome[J]. Fertil Steril, 1994, 81(1): 51-52.
- [4] Azziz R. The evaluation and management of hirsutism obstet[J]. Gynecol, 2003, 101(9): 955-1007.
- [5] Simoni M, Tempfer CB, Destenaves B, et al. Functional genetic polymorphisms and female reproductive disorders: Part I: Polycystic ovary syndrome and ovarian response[J]. Hum Reprod Update, 2008, 14(5): 459-484.
- [6] Li L, Gu ZP, Bo QM, et al. Association of CYP17A1 gene -34T/C polymorphism with polycystic ovary syndrome in Han Chinese population[J]. Gynecol Endocrinol, 2015, 31(1): 40-43.
- [7] 姚满红, 蒋天从, 郭璐莹, 等. CYP17 基因多态性与多囊卵巢综合征关系的系统评价[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2016, 19(11): 1615-1620.
- [8] Guo M, Chen ZJ, Eijkemans MJ, et al. Comparison of the phenotype of Chinese versus dutch caucasian women presenting with polycystic ovary syndrome and oligo/amenorrhoea[J]. Hum Reprod, 2012, 27(5): 1481-1488.
- [9] 林琳. 新疆部分地区维吾尔族, 汉族多囊卵巢综合征的临床研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2010: 1-62.
- [10] DiamantiKandarakis, E, Bartzis, et al. Polymorphism T→C(-34 bp) of gene CYP17 promoter in Greek patients with polycystic ovary syndrome-similarity with the gene for P450c21[J]. Fertil Steril, 1999, 71(3): 431-435.
- [11] 谭丽. 中国汉族人多囊卵巢综合征患者 CYP17 基因多态性分析[J]. 郑州大学学报, 2005, 40(3): 439-440.
- [12] 丁玲玲. 山东汉族妇女多囊卵巢综合征 CYP17 基因多态与高雄激素相关性的研究[D]. 济南: 山东大学, 2007: 1-34.

(收稿日期: 2017-03-14 修回日期: 2017-07-03)

(上接第 3108 页)

- [8] Jain S, Das S, Gupta N, et al. Frequency of fungal isolation and antifungal susceptibility pattern of the fungal isolates from nasal polyps of chronic rhinosinusitis patients at a tertiary care center in north India[J]. Med Mycol, 2013, 51(2): 164-169.
- [9] 史利宁, 陈勇, 邵海枫. 侵袭性曲霉病的快速诊断方法

[J]. 临床检验杂志 2015, 33(6): 450-453.

- [10] 冯潜, 李颖, 顾兵, 等. (1-3)- β -D 葡聚糖联合半乳甘露聚糖抗原检测在侵袭性真菌感染中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(1): 71-73.

(收稿日期: 2017-03-22 修回日期: 2017-07-11)