文章编号:1000-5404(2011)15-1559-04

论著

重庆地区汉族人群 TRB3 基因 +251A/G 多态性与多囊卵巢综合征的相关性分析

田 波,李启富,龚莉琳,宋 颖,钟 立,杨淑敏,赵长虹,黄佳祎,程庆丰,梅 枚,夏 伟,罗 梅 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院内分泌科)

[摘要] **目的** 了解中国重庆地区汉族人群 TRB3 基因外显子 +251A/G 的基因型分布,探讨该基因多态性与多囊卵巢综合征(PCOS)及其糖脂代谢、胰岛素抵抗等的相关性。**方法** 应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法对 139 例 PCOS 患者和 120 例正常对照者 TRB3 基因第 2 外显子 +251A/G 位点进行基因分型,同时进行人体测量学及代谢指标的检测,并对其中的 107 例 PCOS 患者和 20 例正常对照行高胰岛素-正葡萄糖钳夹实验。**结果** TRB3 基因 +251A/G 多态性位点的 3 种基因型 AA、AG、GG 频率在 PCOS 组中分别为 62.59%、33.09%、4.32%,与对照组(60.83%、36.67%、2.5%)相比,差异无统计学意义($\chi^2=0.88$,$P=0.64$)。PCOS 组和对照组等位基因频率分布差异亦无统计学意义($P=0.99$)。PCOS 组 AG/GG 基因型的 LDL-c 和 HDL-c 水平明显低于 AA 基因型($P=0.028$,$P=0.036$)。**结论** TRB3 基因 +251A/G 多态性与重庆地区汉族人群多囊卵巢综合征的发生无关,但可能与 PCOS 患者血脂代谢紊乱有关。

[关键词] 多态性,单核苷酸;TRB3 基因;多囊卵巢综合征
[中图法分类号] R711.75; R589-2; R394-33 [文献标志码] A

Correlation of TRB3 gene +251A/G polymorphism with polycystic ovarian syndrome: a report of 139 cases in Chongqing Han population

Tian Bo, Li Qifu, Gong Lilin, Song Ying, Zhong Li, Yang Shumin, Zhao Changhong, Huang Jiayi, Cheng Qingfeng, Mei Mei, Xia Wei, Luo Mei (Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the genotype distribution of TRB3 exon +251A/G in Han population from Chongqing area, and to explore its correlation with polycystic ovarian syndrome (PCOS), glycolipids metabolism and insulin resistance. **Methods** A total of 139 PCOS patients and 120 matched normal subjects were genotyped by PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Waist circumference, hip circumference, body mass index, plasma glucose, serum insulin, lipid profiles and total testosterone were measured. In a subgroup of this study, the hyperglycemic clamp technique was performed in 107 PCOS and 20 control subjects to evaluate insulin sensitivity. **Results** The frequencies of AA, AG and GG genotypes in PCOS group were 62.59%, 33.09% and 4.32% respectively, and in comparison with those of control group (60.83%, 36.67% and 2.5%), there was no significant difference (Chi-square value = 0.88, $P=0.64$). The allele frequencies also showed no significant difference between the two groups ($P=0.99$). In PCOS group, the LDL-c and HDL-c of the AG/GG genotype were lower than those of AA genotype ($P=0.028$, $P=0.036$, respectively). **Conclusion** TRB3 gene +251A/G polymorphism has no correlation with PCOS in Han population in Chongqing area, but it may be correlated with dyslipidemia in this population.

[**Key words**] polymorphism, single nucleotide; TRB3 gene; polycystic ovarian syndrome

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81070668). Corresponding author: Li Qifu, E-mail: liqifu@yeah.net

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)是一种发病多因性,临床表现多态性的内分泌综合征,相关的代谢失调包括高雄激素血症、胰岛素抵抗、糖脂代谢异常、心血管疾病风险增加等[1-2]。研究显示 PCOS 是一种基因相关性疾病[3-4],胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)不仅是 PCOS 的主要病理生理特征,而且是 PCOS 发病的重要环节[5-6]。TRB3 是果蝇 tribbles 基因的哺乳动物同源基因,具有广泛的生物学功能。近年来有学者报道 TRB3 基因及其 +251A/G

[基金项目] 国家自然科学基金(81070668)
[通信作者] 李启富,E-mail: liqifu@yeah.net

多态性与胰岛素抵抗、糖脂代谢等相关[7-9]，其是否与PCOS及其代谢异常有关联目前国内外尚少见报道。本研究了解中国重庆地区汉族人群该位点的基因型及频率分布，并探讨其与PCOS及其胰岛素抵抗、糖脂代谢等的关系。

1 对象与方法

1.1 研究对象

收集2007年11月至2010年1月在重庆医科大学附属第一医院妇科或辅助生殖中心就诊的PCOS患者139例(PCOS组)，年龄(25.48±4.37)岁，诊断依据2003年鹿特丹标准[10]。我科招募的健康妇女120例(正常对照组)，年龄(26.23±3.14)岁，符合以下标准：月经正常，无多毛、痤疮、秃顶。所有研究对象为重庆地区汉族人群，近3个月未服用过激素类药物和降糖药并排除其他引起高雄激素、排卵障碍的内分泌疾病如先天性肾上腺增生、库欣综合征、分泌雄激素的肿瘤、高催乳素血症、甲状腺疾病和卵巢早衰等。研究方案经我院伦理委员会批准，研究对象均签署知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 病史询问及体格检查 按照统一制定的调查表对研究对象进行病史询问及体格检查，空腹测量身高、体质量、腰围、臀围和血压等，计算体质量指数(BMI)=体质量(kg)/身高^2(m^2)。

1.2.2 生化指标的测定和方法 所有研究对象于月经周期第3~5天(闭经者任何时期)进行口服75 g葡萄糖耐量实验(OGTT)，留取空腹血样用于提取基因组DNA及生化指标的测定。并分别对其中的107例PCOS患者和20例正常对照行高胰岛素-正葡萄糖钳夹实验，以稳态期120~180 min葡萄糖代谢率(M120-180)评估胰岛素敏感性[11]。血糖测定采用葡萄糖氧化酶法；胰岛素和睾酮测定采用化学发光法；血脂测定由全自动生化分析仪完成。借助从www.ocdem.ox.ac.uk下载的HOMA2计算器(V2.2)计算胰岛素分泌功能指数(HOMA2-%B)和胰岛素抵抗指数(HOMA2-IR)。

1.2.3 TRB3基因+251A/G多态性检测 应用聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)检测基因型，每种酶切基因型均通过测序证实。①PCR引物：上游5′-GGCCACCAAG-CAGTCTCAC-3′，下游5′-CGCCCATGATCCCTAAGTTC-3′(上海生工生物工程技术服务有限公司合成)，扩增产物为594 bp。②PCR反应体系25 μl：包括DNA模板4 μl，上下游引物各1 μl，PCRMix(广州东盛生物科技有限公司)12.5 μl，双蒸水6.5 μl。③PCR循环参数：94 ℃预变性5 min，94 ℃变性30 s、65 ℃退火30 s、72 ℃延伸30 s，30个循环后，于72 ℃终末延伸10 min，PCR扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测。④酶切：反应体系20 μl，其中*Msp* Ⅰ(TaKaRa公司)1 μl，PCR产物4 μl，37 ℃温育4 h，酶切产物用2%琼脂糖凝胶电泳进行检测并鉴定基因型，并对其中10%的样本重复进行基因分型，其一致率为100%。

1.3 统计学方法

应用SPSS 13.0统计软件，计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，计数资料以百分率表示。非正态分布资料(FPG、2 h PG、FINS、HOMA2-%B、HOMA2-IR、TG)经log对数转换成正态分布资料后再进行分析，率的比较用χ^2检验；2组间比较用t检验或协方差分析。应用拟合优度χ^2检验组间基因型频率分布是否符合Hardy-Weinberg(H-W)遗传平衡。

2 结果

2.1 一般临床资料

2组年龄、收缩压(SBP)、舒张压(DBP)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-c)差异无统计学意义，PCOS组BMI、腰臀比(WHR)、睾酮(T)、HOMA2-IR、HOMA2-%B、甘油三酯(TG)、空腹胰岛素(FINS)、空腹血糖(FPG)和OGTT糖负荷后2 h血糖(2 h PG)均明显高于对照组($P<0.05$，$P<0.01$)，而M120-180、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-c)明显低于对照组($P<0.01$)。见表1。

2.2 TRB3基因+251A/G多态性酶切电泳及测序分析

PCR扩增产物长594 bp，经限制性内切酶*Msp* Ⅰ水解后获得2个长度为297 bp的酶切片段，可产生AA、AG和GG 3种基因型(图1)。

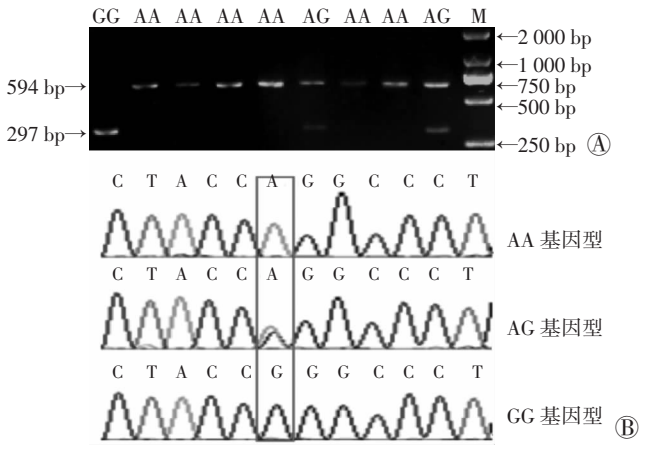


图1 TRB3基因+251A/G位点的酶切电泳(A)及测序分析(B)

表1 PCOS组和正常对照组一般临床资料和代谢指标比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	年龄(岁)	BMI(kg/m^2)	SBP(mmHg)	DBP(mmHg)	WHR	T(ng/dl)	FPG(mmol/L)	2 h PG(mmol/L)
正常对照组	120	26.30±3.20	21.08±2.29	110.60±8.91	70.78±7.53	0.78±0.05	41.86±19.81	4.96±0.37	5.55±1.07
PCOS组	139	25.48±4.37	23.62±4.36[b]	110.83±10.98	69.58±9.53	0.84±0.07[b]	58.96±29.39[b]	5.19±0.60[b]	7.15±1.95[b]

组别	n	FINS(mIU/L)	HOMA2-%B	HOMA2-IR	M120-180 [mg/(kg·min)]	TG(mmol/L)	TC(mmol/L)	LDL-c(mmol/L)	HDL-c(mmol/L)
正常对照组	120	6.79±3.24	96.12±29.98	1.01±0.48	12.08±1.78	0.78±0.42	4.40±0.64	2.11±0.45	1.37±0.27
PCOS组	139	10.38±8.72[b]	114.48±60.62[a]	1.52±1.23[b]	8.25±2.92[b]	1.26±0.73[b]	4.24±0.87	2.07±0.68	1.09±0.24[b]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与正常对照组比较

2.3 TRB3基因+251A/G位点基因型和等位基因分布频率

TRB3基因251位点的基因型频率分布在病例组和对照组中均符合Hardy-Weinberg平衡($P>0.05$)。AA、AG、GG 3种基因型频率分布在PCOS组和对照组间差异无统计学意义($\chi^2=0.88$,$P=0.64$),A、G等位基因频率分布在PCOS组和对照组间亦无显著差异($P=0.99$,表2)。

表2 TRB3基因+251A/G位点的基因型及等位基因分布频率[例(%)]

组别	n	基因型			等位基因	
		AA	AG	GG	A	G
正常对照组	120	73(60.83)	44(36.67)	3(2.5)	190(79.17)	50(20.83)
PCOS组	139	87(62.59)	46(33.09)	6(4.32)	220(79.14)	58(20.86)

2.4 TRB3基因+251A/G位点不同基因型临床及代谢指标的比较

协方差分析校正年龄、BMI后,PCOS组AG/GG基因型携带者的LDL-c和HDL-c水平明显低于AA基因型($P=0.028$,$P=0.036$),而对照组中AG/GG基因型的LDL-c和HDL-c与AA基因型比较无明显差异($P>0.05$)。2组AG/GG基因型的收缩压、舒张压、睾酮、FPG、2 h PG、FINS、HOMA2-% B、HOMA2-IR、M120-180、TG、TC与同组AA基因型比较无统计学差异($P>0.05$,表3)。

3 讨论

本研究显示PCOS组BMI、睾酮、甘油三酯、FPG、2 h PG、空腹胰岛素、HOMA2-IR均明显高于对照组,而M120-180、高密度脂蛋白胆固醇明显低于对照组,提示PCOS组不但雄激素升高,还合并肥胖、糖脂代谢紊乱、胰岛素抵抗等,符合PCOS的临床表现。

TRB3基因定位于人类染色体20p13-p12.2,全长16 896 bp,包含4个外显子和3个内含子,其所在染色体20p13-p12与人类2型糖尿病和肥胖相关联[12]。TRB3是一个具有脚手架样调控功能的蛋白质,有广泛的生物学作用,它可以和丝/苏氨酸蛋白激酶B(PKB/AKT)结合,抑制胰岛素对Akt的激活作用,进而抑制Akt对其底物蛋白如GSK-3β的磷酸化,影响糖原合成及胰岛素对葡萄糖代谢,在胰岛素PI-3K信号转导通路中起着重要的调节作用[13-15];TRB3还可以作用于C/EBPβ、PPARγ等,与脂肪细胞分化、血脂代谢调节等密切相关[16-17]。

本研究探讨了TRB3基因+251A/G多态性与PCOS的关系,结果显示TRB3基因+251A/G位点的3种基因型AA、AG、GG频率及等位基因频率分布在PCOS组和对照组之间无显著差异,表明该位点多态性与重庆地区汉族人群PCOS的发生无关。我们的研究还显示该位点多态性与PCOS和对照组中HOMA2-IR、FPG、2 h PG、FINS等均无明显相关性,高胰岛素-正葡萄糖钳夹术是国际上公认的评估胰岛素敏感性的金标准,我们亦未发现该位点多态性与PCOS和对照组M120-180有明显关联,提示TRB3基因+251A/G多态性可能与重庆地区汉族人群PCOS和正常妇女的胰岛素敏感性和糖代谢等无关。Prudent等[7,18]在无血缘关系的高加索2型糖尿病患者的后代中进行了葡萄糖钳夹实验,结果显示胰岛素敏感性在GG、AG、AA 3种基因型个体间依次递减;在645例非糖尿病人群中他们也发现,与AA基因型受试者比较,AG/GG基因型受试者的血糖水平显著升高,而葡萄糖处置指数显著降低。我们的研究结果与之不同,但与国内Shi等[8]报道的TRB3基因+251A/G多态性与正常人胰岛素敏感性、血糖无关类似。这可能与人种、样本量等有关。

PCOS组AG/GG基因型携带者的LDL-c和HDL-c水平明显低于AA基因型,并且差异有统计学意义,而对照组中这种差异不明显,提示G等位基因可能与PCOS患者血脂代谢紊乱有关。Prudent等[7]发现2型糖尿病患者后代的HDL-c水平在GG、AG、AA 3种基因

表3 2组TRB3基因+251A/G位点不同基因型代谢指标比较(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)

组别	基因型	n	年龄(岁)	BMI(kg/m^2)	SBP(mmHg)	DBP(mmHg)	WHR	T(ng/dl)	FPG(mmol/L)	2 h PG(mmol/L)
正常对照组	AA	73	25.86±2.89	21.07±2.34	110.77±8.73	70.32±8.02	0.78±0.05	41.85±20.56	4.98±0.41	5.57±1.12
	AG/GG	47	26.91±3.62	21.14±2.23	110.62±9.35	71.83±6.62	0.79±0.06	41.55±19.00	4.93±0.30	5.53±1.01
PCOS组	AA	87	25.09±4.53	23.55±4.49	112.89±11.38	70.05±10.48	0.83±0.07	56.07±30.33	5.23±0.67	7.10±1.89
	AG/GG	52	26.13±4.06	23.73±4.18	108.53±10.19	69.06±8.47	0.85±0.06	63.98±27.25	5.13±0.48	7.22±2.05

组别	基因型	n	FINS(mIU/L)	HOMA-2% B	HOMA2-IR	M120-180 [mg/(kg·min)]	TG(mmol/L)	TC(mmol/L)	LDL-c(mmol/L)	HDL-c(mmol/L)
正常对照组	AA	73	7.00±3.43	95.89±27.58	0.52±0.06	12.04±2.33	0.83±0.45	4.35±0.62	2.08±0.45	1.35±0.28
	AG/GG	47	6.40±2.99	95.53±34.00	0.43±0.06	12.13±1.12	0.72±0.36	4.45±0.64	2.14±0.45	1.38±0.26
PCOS组	AA	87	10.67±9.55	112.73±60.14	1.56±1.36	8.45±2.93	1.20±0.70	4.33±0.93	2.16±0.71	1.12±0.26
	AG/GG	52	9.89±7.18	117.42±61.94	1.46±0.99	8.00±2.91	1.35±0.78	4.08±0.75	1.93±0.60[a]	1.03±0.21[a]

a:$P<0.05$,与PCOS组的AA基因型比较

型个体间依次递减,而TG逐次递增,且差异具有统计学意义。Gong等[19]报道代谢综合征人群中GG基因型携带者TG、TC、LDL-c水平显著高于AA基因型,而HDL-c水平显著低于AA基因型。我们的研究也发现PCOS组AG/GG基因型携带者TG水平高于AA基因型,但差异没有统计学意义;另外,我们还发现PCOS组AG/GG基因型携带者的LDL-c水平显著低于AA基因型,这与Gong等[19]的报道不一致。出现差异的原因尚不清楚,可能与疾病种类、疾病多基因与环境因素共同作用的复杂性、入选对象的年龄性别和抽样误差等有关。Qi等[20]发现TRB3通过E3泛素连接酶(COP1)促进脂肪酸合成限速酶乙酰辅酶A羧化酶的(ACC)泛素化和降解,增加脂质的氧化分解,减少脂质的合成。Takahashi等[16]发现3T3-L1前脂肪细胞中过表达的TRB3与转录因子PPARγ相互作用,抑制PPARγ转录活性及其靶基因表达,导致脂肪细胞分化延迟或受阻,TG浓度下降。我们推测TRB3 251位点A→G的基因变异可能导致了TRB3功能改变,影响了其与ACC、PPARγ等作用,在PCOS血脂代谢紊乱的发生中起了一定的作用。

综上所述,TRB3基因+251A/G多态性与中国重庆地区汉族人群PCOS的发生及其胰岛素抵抗无关,但可能与PCOS患者血脂代谢紊乱有关。本研究仅局限于重庆地区汉族人群,TRB3基因+251A/G多态性与PCOS及其代谢异常的关系还需扩大样本量在多民族、多地区进行更广泛深入的研究;另外本研究仅选取了该基因的一个多态性位点,其他多态性位点是否与PCOS有关联还有待于进一步筛查。

参考文献:

[1] Kousta E, Tolis G, Franks S. Polycystic ovary syndrome. Revised diagnostic criteria and long-term health consequences[J]. Hormones (Athens), 2005, 4(3): 133-147.

[2] 白晓苏, 张素华, 丘彦, 等. 罗格列酮对多囊卵巢综合征患者胰岛素敏感性和β细胞功能之改善[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(18): 1894-1896.

[3] Kahsar-Miller M D, Nixon C, Boots L R, *et al*. Prevalence of polycystic ovary syndrome (PCOS) in first-degree relatives of patients with PCOS[J]. Fertil Steril, 2001, 75(1): 53-58.

[4] Prapas N, Karkanaki A, Prapas I, *et al*. Genetics of polycystic ovary syndrome[J]. Hippokratia, 2009, 13(4): 216-223.

[5] Ovalle F, Azziz R. Insulin resistance, polycystic ovary syndrome, and type 2 diabetes mellitus[J]. Fertil Steril, 2002, 77(6): 1095-1105.

[6] Goodarzi M O, Dumesic D A, Chazenbalk G, *et al*. Polycystic ovary syndrome: etiology, pathogenesis and diagnosis[J]. Nat Rev Endocrinol, 2011, 7(4): 219-231.

[7] Prudente S, Hribal M L, Flex E, *et al*. The functional Q84R polymorphism of mammalian Tribbles homolog TRB3 is associated with insulin resistance and related cardiovascular risk in Caucasians from Italy[J]. Diabetes, 2005, 54(9): 2807-2811.

[8] Shi Z, Liu J, Guo Q, *et al*. Association of TRB3 gene Q84R polymorphism with type 2 diabetes mellitus in Chinese population[J]. Endocrine, 2009, 35(3): 414-419.

[9] Formoso G, Di-Tomo P, Andreozzi F, *et al*. The TRIB3 R84 variant is associated with increased carotid intima-media thickness *in vivo* and with enhanced MAPK signalling in human endothelial cells[J]. Cardiovasc Res, 2011, 89(1): 184-192.

[10] 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.

[11] Yang S, Li Q, Zhong L, *et al*. Serum pigment epithelium-derived factor is elevated in women with polycystic ovary syndrome and correlates with insulin resistance[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2011, 96(3): 831-836.

[12] Permutt M A, Wasson J C, Suarez B K, *et al*. A genome scan for type 2 diabetes susceptibility loci in a genetically isolated population[J]. Diabetes, 2001, 50(3): 681-685.

[13] Du K, Herzig S, Kulkarni R N, *et al*. TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver[J]. Science, 2003, 300(5625): 1574-1577.

[14] Wang Y G, Shi M, Wang T, *et al*. Signal transduction mechanism of TRB3 in rats with non-alcoholic fatty liver disease[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(19): 2329-2335.

[15] Liu J, Wu X, Franklin J L, *et al*. Mammalian Tribbles homolog 3 impairs insulin action in skeletal muscle: role in glucose-induced insulin resistance[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2010, 298(3): E565-E576.

[16] Takahashi Y, Ohoka N, Hayashi H, *et al*. TRB3 suppresses adipocyte differentiation by negatively regulating PPARgamma transcriptional activity[J]. J Lipid Res, 2008, 49(4): 880-892.

[17] Bezy O, Vernochet C, Gesta S, *et al*. TRB3 blocks adipocyte differentiation through the inhibition of C/EBPbeta transcriptional activity[J]. Mol Cell Biol, 2007, 27(19): 6818-6831.

[18] Prudente S, Scarpelli D, Chandalia M, *et al*. The TRIB3 Q84R polymorphism and risk of early-onset type 2 diabetes[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2009, 94(1): 190-196.

[19] Gong H P, Wang Z H, Jiang H, *et al*. TRIB3 functional Q84R polymorphism is a risk factor for metabolic syndrome and carotid atherosclerosis[J]. Diabetes Care, 2009, 32(7): 1311-1313.

[20] Qi L, Heredia J E, Altarejos J Y, *et al*. TRB3 links the E3 ubiquitin ligase COP1 to lipid metabolism[J]. Science, 2006, 312(5781): 1763-1766.

(**收稿**:2011-01-27;**修回**:2011-03-18)

(编辑 龙 亮)