论 著

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001062

KISS1R 基因突变所致的一个特发性低促性腺激素性性腺功能减退症家系分析

周庆菊，杨 利，赵红燕，何 丽，陈 晓，李 岱，敬媛媛，吴 凡，李 蓉
（重庆医科大学附属第一医院内分泌科，重庆 400016）

【摘 要】**目的**：本研究旨在收集一个特发性低促性腺激素性性腺功能减退症（idiopathic hypogonadotropic hypogonadism，IHH）的家系成员资料，通过基因检测确定其突变位点，丰富疾病突变谱。**方法**：对家系成员进行病史采集、生化及影像学检查。应用高通量测序技术检测先证者突变位点，Sanger 测序技术对先证者及家系成员进行基因型验证。**结果**：该家系为近亲结婚家系，先证者为 25 岁女性，表现为青春期发育延迟、原发性闭经、不孕、促性腺激素及性激素水平低下，先证者妹妹及弟弟也存在明显青春期发育延迟，父母为表兄妹关系且临床表型正常。基因检测结果示先证者 *KISS1R* 基因 5 号外显子上，第 983 号碱基胞嘧啶突变为腺嘌呤（c.C983A），使第 328 号氨基酸丝氨酸突变为终止密码子（p.S328X），蛋白质翻译提前终止。父母为该突变位点的杂合子，妹妹为纯合子。**结论**：通过基因检测，发现了 *KISS1R* 基因上的一个新的致病突变 c.C983A（p.S328X）。

【关键词】特发性低促性腺激素性性腺功能减退症；基因突变；无义突变；*KISS1R*
【中图分类号】R588.6 【文献标志码】A 【收稿日期】2016-07-20

KISS1R gene mutation analysis in a family with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism

Zhou Qingju, Yang Li, Zhao Hongyan, He Li, Chen Xiao, Li Dai, Jing Yuanyuan, Wu Fan, Li Rong
(*Department of Endocrinology, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To detect the unknown mutation gene and to expand the mutation spectrum by describing a Chinese family with idiopathic hypogonadotropic hypogonadism(IHH). ***Methods***: Clinical information of family members were collected. Second-generation sequencing technology was used to determine the proband's mutation. Sanger sequencing was used to confirm proband's mutation results and to detect her parents and younger sister. ***Results***: In the inbreeding family, the proband (25-year-old) showed delayed puberty, primary amenorrhea, infertility, lack of gonadotropins and other typical manifestations of IHH. The proband's younger brother and sister were also showed delayed puberty. The proband's parents are cousins and are healthy. Sequencing analysis identified a novel nonsense mutation in exon 5 of the *KISS1R* gene(c.C983A, p. S328X). The proband and her sister were in homozygous state and her parents were in heterozygous state. ***Conclusion***: We have identified a novel homozygous nonsense mutation in the *KISS1R* gene causing IHH.

【Key words】idiopathic hypogonadotropic hypogonadism; gene mutation; nonsense mutation; *KISS1R*

特发性低促性腺激素性性腺功能减退症（idiopathic hypogonadotropic hypogonadism，IHH）又称先天性性腺功能减退症，是一类少见的生殖内分泌疾病，在人群中患病率为（1~10）/十万，男女患病率之比为（2~5）：1[1-2]。IHH 以青春期发育延迟或缺乏、性激素及促性腺激素水平低下为主要表现，无下丘脑-垂体-性腺轴器质性改变。

研究发现，IHH 是一种复杂的遗传性疾病，遗传方式主要有常染色体显性遗传、常染色体隐性遗传及 X 染色体隐性遗传[3]。因 IHH 为促性腺激素释放激素（gonadotropin-releasing hormone，GnRH）缺乏所致，故所有影响 GnRH 激活、分泌及释放的基因均与其发生相关。但现报道的致病基因及突变位点只能解释临床上 30%~50%的病例[4]，尚需更多研究协助疾病诊疗。

作者介绍：周庆菊，Email：cqmuzqj@163.com，
研究方向：内分泌及代谢疾病。
通信作者：李 蓉，Email：rongli232006@163.com。
基金项目：国家临床重点专科建设资助项目（编号：财社[2011]170 号）。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20161118.1107.024.html（2016-11-18）

1 对象与方法

1.1 研究对象

本研究家系包含 2 代 5 名成员，先证者因“青春期发育延迟、原发性不孕”就诊于重庆医科大学附属第一医院内分泌内科。本研究符合 1975 年赫尔辛基宣言，并取得患者知情同意。

1.2 生化及影像学检测

先证者完善肝肾功、血尿常规、垂体激素、GnRH 兴奋试验、妇科超声、腹部超声、下丘脑-垂体磁共振、骨密度测定等检查。

1.3 基因组 DNA 提取

抽取先证者及家系成员 2 mL 新鲜全血送北京德易东方转化医学研究中心提取全基因组 DNA。

1.4 高通量测序

具体流程包括文库制备、测序及分析。

1.4.1 文库制备 基因组 DNA 的片段化；DNA 末端补平修复；修复产物 3’端腺苷化；T_4 DNA 连接酶加接头；LM-PCR扩增；杂交洗涤；洗涤产物扩增。

1.4.2 测序及分析 使用 Illumina 平台进行测序并得到原始数据，原始数据产量统计，数据与参考基因组(hg19)比对；使用 samtool 软件进行单核苷酸多态性位点检测及注释；使用 pindel 软件进行插入缺失位点检测及注释；使用 SIFT 预测突变对蛋白功能的影响，对剪切位点附近突变做危害性预测。

1.5 一代测序(Sanger 法)验证

根据 *KISSIR* 基因验证位点序列设计引物，采用 PCR 方法进行扩增，引物序列见表 1。PCR 反应条件如下：95 ℃预变性 5 min；95 ℃变性 30 s，62 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 90 s，扩增 30 个循环；72 ℃补充延伸 10 min。PCR 扩增产物使用 ABI3730XL 测序仪测序，测序引物采用原 PCR 引物。使用 DNASTAR 软件进行序列分析和比对，mRNA 比对模板为 NM_032551.4。

表 1 *KISSIR* 基因 PCR 引物

Tab.1 PCR primers of *KISSIR* gene

引物名称	碱基序列	退火温度	扩增产物大小
GU106-2F-1	CCTCAACCCGCACTGGACACTCCT	60 ℃	1 560 bp
GU106-2R-2	ACTTCACAACGAAACTGCACCGAACGTC		

2 结 果

2.1 临床资料

该家系为近亲结婚家系，父母(Ⅰ-1、Ⅰ-2)为表兄妹关系且临床表型正常。先证者、妹妹及弟弟(Ⅱ-1、Ⅱ-2、Ⅱ-3)均表现为青春期发育延迟。根据临床表型绘制系谱图(图1)。

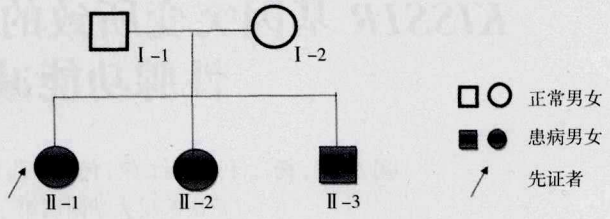


图 1 家系系谱图

Fig.1 Pedigree of the reported family

2.1.1 Ⅱ-1(先证者) 25 岁女性，16 岁仍无月经来潮。当地医院予“补佳乐+黄体酮”治疗后建立月经周期。结婚 3 年至今未孕，克罗米芬促排卵效果不佳。2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus，T2DM)病程 1 年。无全身性疾病、进食障碍、精神刺激、长期剧烈运动等导致性腺功能减退的情况[5]。体格检查：体质量 62 kg，身高 168 cm，上部量 87 cm，下部量 90 cm，腋毛稀疏色浅，乳房 Tanner 分期Ⅲ期(乳头隆起，乳晕继续扩大，乳房轮廓无分界线)，阴毛 Tanner 分期Ⅳ期(阴毛超过阴阜，色黑，且继续增粗蜷曲，未形成倒三角分布)，如图 2A~C 所示。



A. 先证者乳房正面图 B. 先证者乳房侧面图 C. 先证者会阴正面图

图 2 先证者乳房及会阴图

Fig.2 Breast and perineum images of proband

2.1.2 Ⅱ-2(先证者妹妹) 23 岁女性，17 岁时仍无月经来潮。外院予以药物治疗后(具体不详)建立月经周期。结婚 2 年至今未孕，促排卵治疗效果不佳。未配合查体。

2.1.3 Ⅱ-3(先证者弟弟) 20 岁男性，17 岁开始遗精，童声，性功能低下。查体：喉结不明显，无腋毛生长，胡须、阴毛稀少，阴茎短小，左侧隐睾，右侧小睾丸。当地医院测促性腺激素及性激素水平低下。以上资料均由患者口述提供。

2.2 辅助检查结果

2.2.1 生化检查 肝肾功、血尿常规未见异常。性激素结果示黄体生成素(luteinizing hormone，LH)、促卵泡激素(follicle stimulating hormone，FSH)、雌二醇(estradiol，E2)低下[6]，见表 2。其他垂体前叶激素如生长激素、促肾上腺皮质激素、催乳素、促甲状腺激素正常。曲普瑞林及戈那瑞林兴奋试验示 LH 60 min<6 IU/L(表 3)，提示性腺轴未启动[7]，除外体质性青春期发育延迟(constitutional pubertal delay，CDP)[7-8]。

表 2 先证者性激素检查结果

Tab.2 Sex hormone results of proband

项目	黄体生成素(IU/mL)	促卵泡激素(mIU/mL)	孕酮(ng/mL)	睾酮(ng/mL)	雌二醇(pg/mL)	催乳素(ng/mL)
检测值	0.76	0.73	0.65	0.26	16.00	8.51
参考值范围	1.20~10.89	1.79~8.78	0.31~18.56	<0.75	27.00~291.00	3.34~25.72

表 3 先证者戈那瑞林和曲普瑞林兴奋试验结果(mIU/mL)

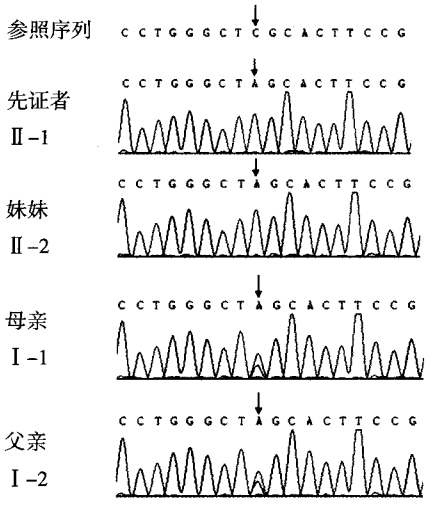
Tab.3 Gonadorelin and triptorelin stimulation test results of proband(mIU/mL)

用药后时间	戈那瑞林(100 μg im)		曲普瑞林(100 μg im)	
(min)	FSH	LH	FSH	LH
0	1.38	2.06	1.05	0.52
30	2.29	1.84	2.79	1.67
60	2.72	1.59	3.18	2.09
120	2.68	1.45	3.40	1.80

2.2.2 影像学检查 妇科超声示子宫约 54 mm×35 mm×20 mm，内膜厚 3 mm，左右卵巢分别可见 10~12 个囊泡样无回声区。垂体磁共振示垂体前后叶间有一大小约 7.87 mm×6.04 mm 的拉特克(Rathke)囊肿。骨密度检测提示腰椎 Z 值为-2.9，髋部 Z 值为-1。腹部超声未见异常。

2.3 基因检测结果

先证者 19 号染色体上 *KISS1R* 基因 5 号外显子存在一个无义纯合突变，第 983 号碱基胞嘧啶突变成腺嘌呤，使正常编码的第 328 号氨基酸丝氨酸突变成终止密码子，随后的 71 个氨基酸均无法表达，蛋白质翻译提前终止(图 3)，一代测序结果与高通量测序结果一致。点位验证结果提示，有临床表型的妹妹(Ⅱ-2)为纯合子，无临床表型的父母(Ⅰ-1 及Ⅰ-2)为杂合子(图 3)。



箭头标示为 *KISS1R* 基因突变位点 c.C983A，Ⅱ-1 及Ⅱ-2 为纯合子，Ⅰ-1 及Ⅰ-2 为杂合子

图 3 家系成员 *KISS1R* 基因测序结果

Fig.3 Results of family members' *KISS1R* gene sequencing

3 讨 论

KISS1R 是 IHH 的重要致病基因之一，在青春期启动中发挥主导作用[1]。本研究发现 *KISS1R* 基因上一个新的突变位点，该突变产生的提前终止密码子(premature translational-termination codon，PTC)位于最后一个外显子上，可能通过逃脱无义介导的 mRNA 降解(nonsense-mediated mRNA decay，NMD)作用致病。

IHH是因先天因素使下丘脑 GnRH 合成、分泌或作用障碍，致促性腺激素及性激素水平降低，性腺功能不全的一类疾病，以第二性征发育不良或缺乏、配子生成障碍为主要表现。若男性≥18 岁、女性>14 岁尚无第二性征出现且性激素水平低下时考虑 IHH[7]，需进一步除外 CDP、中枢肿瘤性病变、中枢感染性疾病、头颅外伤、慢性消耗性疾病、长期营养不良等继发性因素所致的性腺功能减退。CDP 是正常青春期发育的特殊类型，此病也表现为青春期发育延迟，故最易与 IHH 混淆[10]。临床上可通过 GnRH兴奋试验协助鉴别(CDP 时戈那瑞林兴奋试验 LH 60 min≥8 IU/L，或曲普瑞林兴奋试验 LH60 min≥12 IU/L[7])。

该家系中先证者表现为青春期发育延迟、原发性闭经、不孕、上部量/下部量<1、性激素及促性腺激素水平低下、骨密度降低等典型低促性腺激素性性腺功能减退症表现，戈那瑞林及曲普瑞林试验提示性腺轴尚未启动[7]，除外 CDP。此外，先证者 BMI 在正常范围，血尿常规、肝肾功、垂体前叶激素及垂体磁共振等未见异常，除外继发性因素所致性腺功能减退。

胰岛素在下丘脑-垂体-性腺轴的生理活动中起重要作用，T2DM 患者后期胰岛素分泌减少，影响性腺轴功能致性腺功能减退。本研究先证者合并存在性腺功能减退及 T2DM，但 T2DM 病程短，故性腺功能减退并非 T2DM 导致。进一步基因检测发现先证者 *KISS1R* 基因上存在一个无义纯合突变 c.C983A (p.S328X)，进一步基因水平上证实了 IHH。发病的妹妹为纯合子，未发病的父母为杂合子，符合孟德

尔遗传规律，呈常染色体隐性遗传。

KISS1 是人体重要的肿瘤转移抑制基因，在人黑色素瘤细胞杂交体系中发现[11-12]，其编码产物为 kisspeptin。*KISS1R* 基因位于人染色体 19p13.3 上，其编码产物 GPR54 为 kisspeptin 的特异性受体，含 7 个 α 螺旋组成的疏水性跨膜区域[9]。2001 年，Muir 等[13]首次在人下丘脑中发现 *KISS1R* mRNA 的表达。研究发现，青春期发育阶段 *KISS1* 基因表达水平上升，kisspeptin 生成增多，与下丘脑 GnRH 神经元上的 KISS1R 特异性结合，使 GnRH 脉冲式释放从而启动青春期发育[14]。*KISS1R* 基因突变在近亲家系中常见，多为错义突变。Nimir 等[15]在一个以色列近亲结婚的IHH 家系中发现 *KISS1R* 基因 5 号外显子上的错义纯合突变 c.T815C(p.F272S)。随后，Cerrato[16]、Brioude[17]等也分别在近亲结婚 IHH 家系中发现了 *KISS1R* 基因的错义突变。本研究中家系 *KISS1R* 基因的突变方式为无义突变，属少见突变类型。

NMD 是真核生物体内的一种 mRNA 质量监控机制，可识别含有 PTC 的转录产物并将其降解，防止有害截短蛋白产生。但若 PTC 在最后一个外显子，突变转录产生的截短 mRNA 便可逃脱 NMD 作用，产生有害截短蛋白致病。Demirbilek 等[18]在 7 例 IHH 患者中发现 *KISS1R* 基因无义纯合突变 c.C969A (p.Y323X)，该突变产生的 PTC 位于最后一个外显子上，逃脱了 NMD 作用而致病。本研究无义纯合突变 c.C983A(p.S328X)产生的 PTC 也位于最后一个外显子上，且与 Demirbile 报告的突变位点 c.C969A (p.Y323X)在位置上高度接近，故本课题组推测，该基因突变导致 IHH 的机制可能与 PCT 逃脱 NMD 作用相关。

4 结 论

综上所述，本研究收集了一个近亲结婚 IHH 家系，经基因检测发现该家系 *KISS1R* 基因上一个新的突变位点 c.C983A(p.S328X)，该突变呈常染色体隐性遗传，为无义纯合突变，属罕见突变类型，其致病机制尚需进一步功能试验予以探讨。

参 考 文 献

[1] Zhang Y, Zhang H, Qin Y, et al. Mutations in KISS1 are not responsible for idiopathic hypogonadotropic hypogonadism in Chinese patients[J]. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2015, 32(3): 375-378.

[2] 张意茗. 特发性低促性腺激素性性腺功能减退症致病基因筛选及 IVF 妊娠结晶分析[D]. 青岛：山东大学，2015.

[3] 刘儒雅，李小英. 特发性低促性腺激素性性腺功能减退症的遗传学研究进展[J]. 中华内分泌代谢杂志，2012，28(3)：244-248.

[4] Gürbüz F, Kotan LD, Mengen E, et al. Distribution of gene mutations associated with familial normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism[J]. J Clin Res Pediatr Endocrinol, 2012, 4(3): 121-126.

[5] 叶天民. Kallmann 氏综合征的分子遗传学研究[D].长沙：中南大学，2004.

[6] 肖帮惠，时立新，彭年春，等. 特发性低促性腺激素性性功能减退症 4 例[J]. 贵阳医学院学报，2013，38(3)：335-336.

[7] 中华医学会内分泌学分会性腺学组. 特发性低促性腺激素性性腺功能减退症诊治专家共识[J]. 中华内科杂志，2015，54(8)：739-744.

[8] 丁艳霞，李志臻，王庆祝，等. 曲普瑞林兴奋试验对青春发育延迟的诊断意义：128 例报告[J]. 中华内分泌代谢杂志，2014，30(6)：482-485.

[9] Cerrato F, Seminara SB. Human genetics of GPR54[J]. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders, 2007, 8(1): 47-55.

[10] 伍学焱，茅江峰，史轶蘩，等. 青春发育异常的分类和诊断[J]. 中国实用内科杂志，2007，27(23)：1819-1821.

[11] Lee JH, Welch DR. Identification of highly expressed genes in metastasis-suppressed chromosome 6/human malignant melanoma hybrid cells using subtractive hybridization and differential display[J]. International Journal of Cancer, 1997, 71(6): 1035-1044.

[12] Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, et al. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene[J]. Journal of the National Cancer Institute, 1996, 88(23): 1731-1737.

[13] Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, et al. AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1[J]. J Biol Chem, 2001, 276(31): 28969-28975.

[14] 孙兆贵，顾 正，王 健. KiSS-1/GPR54 系统的生殖内分泌功能研究进展[J]. 生殖与避孕，2009，29(6)：374-384.

[15] Nimri R, Lebenthal Y, Lazar L, et al. A novel loss-of-function mutation in GPR54/KISS1R leads to hypogonadotropic hypogonadism in a highly consanguineous family[J]. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2011, 96(3): E536-545.

[16] Cerrato F, Shagoury J, Kralickova M, et al. Coding sequence analysis of GNRHR and GPR54 in patients with congenital and adult-onset forms of hypogonadotropic hypogonadism[J]. European Journal of Endocrinology, 2006, 155(S1): 3-10.

[17] Brioude F, Bouligand J, Francou B, et al. Two families with normosmic congenital hypogonadotropic hypogonadism and biallelic mutations in KISS1R (KISS1 receptor): clinical evaluation and molecular characterization of a novel mutation[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e53896.

[18] Demirbilek H, Ozbek MN, Demir K, et al. Normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism due to a novel homozygous nonsense c.C969A(p.Y323X) mutation in the KISS1R gene in three unrelated families[J]. Clinical Endocrinology, 2015, 82(3): 429-438.

（责任编辑：唐秋姗）