

[文章编号] 1674-8115(2011)07-0932-05

· 论著 ·

生长激素受体基因多态性与特发性矮小遗传易感性的关系

于 意¹, 王 伟¹, 王 莹², 黄 徽², 董治亚¹, 滕月春¹, 倪继红¹, 肖 园¹, 王德芬¹

(1. 上海交通大学医学院附属瑞金医院儿科, 上海 200025; 2. 国家人类基因组南方研究中心, 上海 201203)

[摘要] 目的 探讨人生长激素受体(GHR)基因的单核苷酸多态性(SNP)与中国汉族人群特发性矮小(ISS)遗传易感性的关系。方法 采用病例对照法,在199例ISS患儿(ISS组)和469名身高正常成人(对照组)中,对GHR基因16个SNP位点进行基因分型和比较,筛查阳性SNP位点(特异基因型频率差异有统计学意义),分析阳性SNP位点基因型与ISS发病风险及血清胰岛素样生长因子1(IGF-1)等相关临床变量的关系。结果 在ISS组和对照组中,发现3个阳性SNP位点rs6182($P = 0.027$)、rs4410646($P = 0.01$)和rs10044169($P = 0.024$)。①rs6182(G/T):在T显性模式下,TT和GT基因型的ISS发病风险降低($OR = 0.624$, 95% CI: 0.402 ~ 0.969, $P = 0.021$)。②rs4410646(A/C):在C显性模式下AA基因型的ISS发病风险降低($OR = 0.674$, 95% CI: 0.475 ~ 0.958, $P = 0.016$);该位点的多因素Logistics回归分析显示,以CC基因型为参照,血清IGF-1与基因型AA($OR = 1.011$, 95% CI: 1.002 ~ 1.020, $P = 0.018$)和CA($OR = 1.010$, 95% CI: 1.001 ~ 1.019, $P = 0.037$)相关;以AA基因型为参照,血清IGF-1与基因型CC相关($OR = 0.989$, 95% CI: 0.980 ~ 0.998, $P = 0.018$)。③rs10044169(A/C):在C显性模式下,CC和CA基因型的ISS发病风险降低($OR = 0.649$, 95% CI: 0.424 ~ 0.993, $P = 0.027$)。结论 GHR在生长激素介导的促生长效应中起重要作用,人类GHR基因的3个SNP位点可能与ISS的遗传易感性有关。

[关键词] 特发性矮小;生长激素受体;单核苷酸多态性;胰岛素样生长因子1;遗传易感性

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2011.07.014

[中图分类号] R394.5

[文献标志码] A

Associations of single nucleotide polymorphisms of growth hormone receptor with susceptibility to idiopathic short stature

YU Yi¹, WANG Wei¹, WANG Ying², HUANG Wei², DONG Zhi-ya¹, TENG Yue-chun¹, NI Ji-hong¹, XIAO Yuan¹, WANG De-fen¹(1. Department of Pediatrics, Ruijin Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200025, China;
2. National Human Genome Center at Shanghai, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the associations of single nucleotide polymorphisms (SNP) of human growth hormone receptor (GHR) with genetic susceptibility to idiopathic short stature (ISS) in Chinese Han populations. **Methods** Case-control method was employed, and 199 children with ISS (ISS group) and 469 adults with normal weight (control group) were enrolled. Genotyping and comparison were performed in 16 SNP sites of GHR gene, positive SNP sites (significant differences in specific genotypic frequency) were screened, and the associations of genotypes of positive SNP sites with risks of ISS and related clinical variables such as serum insulin-like growth factor 1 (IGF-1) were analysed. **Results** Three positive SNP sites of rs6182 ($P = 0.027$), rs4410646 ($P = 0.01$) and rs10044169 ($P = 0.024$) were found in ISS group and control group. For rs6182 (G/T), the risk of ISS of genotype TT and genotype GT decreased under T dominant mode ($OR = 0.624$, 95% CI: 0.402 ~ 0.969, $P = 0.021$). For rs4410646 (A/C), the risk of ISS of genotype AA decreased under C dominant mode ($OR = 0.674$, 95% CI: 0.475 ~ 0.958, $P = 0.016$). Multivariate Logistics regression analysis of this site revealed that serum IGF-1 was related to genotype AA ($OR = 1.011$, 95% CI: 1.002 ~ 1.020, $P = 0.018$) and genotype CA ($OR = 1.010$, 95% CI: 1.001 ~ 1.019, $P = 0.037$) with genotype CC as reference, and serum IGF-1 was related to genotype CC ($OR = 0.989$, 95% CI: 0.980 ~ 0.998, $P = 0.018$) with genotype AA as reference. For rs10044169 (A/C), the risk of ISS of genotype CC and genotype CA significantly decreased ($OR = 0.649$, 95% CI: 0.424 ~ 0.993, $P = 0.027$) under C dominant mode.

[基金项目] 国家自然科学基金(30771029)(National Natural Science Foundation of China, 30771029)。

[作者简介] 于 意(1981—), 女, 硕士生; 电子信箱: ruyilx@gmail.com。

[通信作者] 王 伟, 电子信箱: rjwangwei@yahoo.cn。

dominant mode. **Conclusion** GHR plays a role in the growth promotion effect mediated by growth hormone, and 3 SNP sites of human GHR gene may be related to genetic susceptibility to ISS.

[Key words] idiopathic short stature; growth hormone receptor; single nucleotide polymorphism; insulin-like growth factor 1; susceptibility

特发性矮小 (idiopathic short stature, ISS) 是指人体身高低于同种族、同年龄、同性别正常健康儿童平均身高的 -2 个标准差或第 3 百分位数, 无染色体异常和其他疾病史 (如内分泌、营养性疾病等)。临幊上常将 ISS 分为家族性 ISS 和非家族性 ISS。人体矮小可严重影响患儿的心理健康和社会交往能力。生长激素 (growth hormone, GH)/胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1) 轴对人体生长发育的内分泌调节至关重要, 其中生长激素受体 (growth hormone receptor, GHR) 是该轴在细胞水平上的重要调节因子。GHR 基因缺陷可引起 GH 不敏感综合征 (Laron 综合征) 和部分 GH 不敏感的 ISS。目前, 已有文献报道某些矮小候选基因的标签单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 与发生矮小的风险相关, GHR 基因外显子 3 与重组人生长激素 (recombinant human growth hormone, rhGH) 疗效有关; 但尚未见 GHR 基因其他多态性相关分析的报道。

GHR 基因位于 5 号染色体短臂上, 约长 87 kb, 由 10 个外显子和 9 个内含子构成; 外显子 2~7 编码胞外部分, 8 编码跨膜区, 9 和 10 编码胞内部分。本研究针对人类 GHR 基因的 16 个 SNP 位点进行病例对照研究, 探讨 GHR 基因 SNP 与 ISS 矮小表型易感性之间的关系, 为临幊预测 ISS 发病风险提供依据。

1 对象与方法

1.1 对象

选取 2001—2009 年在上海交通大学医学院附属瑞金医院儿科就诊的 199 例 ISS 患儿作为 ISS 组, 其中男性 137 例, 女性 62 例, 平均年龄为 (10.32 ± 3.05) 岁。ISS 组入选标准: ①身高低于同年龄、同性别儿童标准身高 -2 个标准差; ②GH 药物激发试验 (精氨酸和可乐宁) 中, 至少 1 项 GH 峰值 > 7 ng/mL; ③血常规、甲状腺功能和肝肾功能检查均无异常; ④出生体质量及身长在正常范围内; ⑤排除其他遗传代谢病、染色体异常、先天性骨骼异常和慢性疾病。以上海交通大学和华东理工大学的 469 名学生作为对照组, 其中男性 217 名, 女性 252 名, 年龄均 >

18 岁, 身高及体质量指数 (body mass index, BMI) 均在同性别成人正常范围内。

1.2 方法

1.2.1 临床指标测定 测量身高和体质量; 检测血清 IGF-1 和胰岛素样生长因子结合蛋白 3 (insulin-like growth factor binding protein 3, IGFBP3); 进行 GH 药物激发试验; 计算 BMI、身高标准差计分 (height standard deviation score, HtSDS) 和遗传靶身高 (target height, THt)。

1.2.2 候选基因 SNP 位点的筛查 依据连锁不平衡 (linkage disequilibrium, LD) 的标签 SNP 策略, 通过对少量标签 SNP 的分型, 可以最大限度地覆盖所有 SNP 位点。由国际 HapMap 数据库 (www.hapmap.org, NCBI Build 36) 获得 GHR 基因共存在 377 个 SNP 位点, 依据我国北京汉族人群 (Han Chinese in Beijing, China, CHB) 亚群的 SNP 频率选择标签 SNP 位点。最终选定 16 个优化标签 SNP 位点, 即 rs12515480、rs6451620、rs2940913、rs4410646、rs4489074、rs6887718、rs12233949、rs4242115、rs7701605、rs4242117、rs10044169、rs2972781、rs12187996、rs6182、rs6183 和 rs2910875, 连锁不平衡系数 (r^2) > 0.8, 最小等位基因频率 (minor allele frequency, MAF) > 0.05。GHR 基因上 16 个标签 SNP 位点分布见图 1。

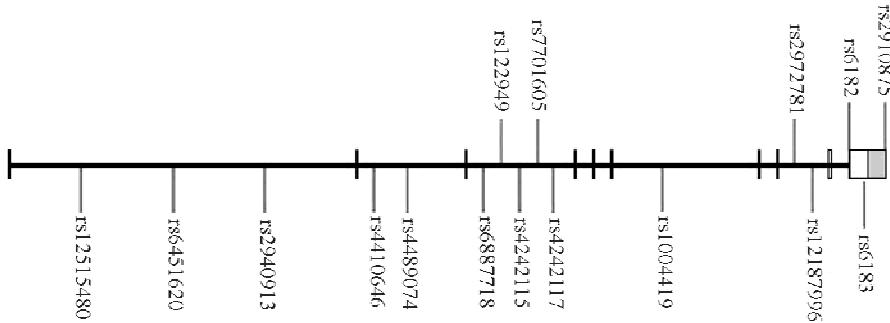
1.2.3 SNP 位点基因分型 采用 FlexiGen DNA 抽提试剂盒 (Qiagen, Cat. No. 51206) 抽提外周血 DNA。SNP 基因型检测采用 Illumina 公司的高通量基因分型系统 (GoldenGate™ 技术), 即相对分子质量阵列平台, 其针对 SNP 位点不同等位基因的引物特异性延伸和 PCR 扩增技术可同时对 1 000 多个 SNP 位点的引物进行延伸和扩增, 确保了多位点扩增的效率和统一性。反应条件: 95 ℃ 预变性 3 min; 95 ℃ 变性 35 s, 56 ℃ 退火 35 s, 72 ℃ 延伸 2 min, 共 34 个循环; 72 ℃ 终延伸。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析。设定 MAF > 0.01。采用 PLINK-doc-1.04 统计分析软件进行 Hardy-Weinberg 分布检验。采用 HaploView 软件

进行连锁不平衡(Linkage disequilibrium, LD)和单体型分析。采用 χ^2 检验进行 SNP 位点基因型的病例对照分析,筛选阳性 SNP 位点;阳性 SNP 位点基因型与

ISS 发病风险及其相关临床变量的关系分析采用单因素方差分析、*t* 检验和多因素 Logistic 回归分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。



注:图中黑线表示内含子,黑色方框表示外显子,灰色填充的方框表示3'非编码区。

图 1 GHR 基因 16 个 SNP 位点模式图

Fig 1 Diagram of 16 SNPs in GHR gene

2 结 果

2.1 人群基因型分布的 Hardy-Weinberg 检验

ISS 组和对照组 GHR 基因 SNP 位点基因型分布均符合 Hardy-Weinberg 平衡($P > 0.05$),具有人群代表性。

2.2 ISS 组与对照组的基本情况

ISS 组和对照组平均 BMI 分别为 (16.37 ± 3.18) kg/m² 和 (21.41 ± 2.64) kg/m²。ISS 组 HtSDS 为 3.03 ± 0.90 , 血清 GH 激发峰值为 (15.92 ± 9.23) ng/mL, 血清 IGF-1 为 (231.98 ± 154.99) ng/mL ($n = 180$), 血清 IGFBP3 为 (4377.91 ± 1509.63) ng/mL ($n = 176$)。

2.3 基因型分析和阳性 SNP 位点的筛查

在 ISS 组与对照组的对照分析中,发现 GHR 基因 3 个阳性 SNP 位点(特异基因型分布频率比较差异有统计学意义),分别为 rs6182、rs4410646 和 rs10044169(表 1)。ISS 组与对照组 rs6182 的 GG 基因型频率分别为 84.4% 和 77.2% ($\chi^2 = 6.74, P = 0.027$),rs4410646 的 AA 基因型频率分别为 31.7% 和 40.7% ($\chi^2 = 9.39, P = 0.01$),rs10044169 的 AA 基因型频率分别为 82.9% 和 75.9% ($\chi^2 = 6.92, P = 0.024$)。

2.4 单倍域分析

LD 分析发现:GHR 基因 3 个阳性 SNP 位点均不在同一个单倍域中,并可将之分为 3 个紧密连锁区块(Block)(图 2)。① Block 2: rs4410646 与 rs4489074($D' = 1, r^2 = 0.07$);② Block 3: rs10044169 与 rs2972781($D' = 1, r^2 = 0.10$);③ Block 4: rs6182

与 rs12187996($D' = 1, r^2 = 0.19$)。

2.5 阳性 SNP 位点基因型与 ISS 发病风险的关系

ISS 组和对照组 GHR 基因 3 个阳性 SNP 位点的基因型分布特点见表 2,统计学分析结果如下。①rs6182(G/T):在 T 显性模式下,TT 和 GT 基因型的 ISS 发病风险降低($OR = 0.624, 95\% CI: 0.402 \sim 0.969, P = 0.021$)。②rs4410646(A/C):在 C 显性模式下,AA 基因型的 ISS 发病风险降低($OR = 0.674, 95\% CI: 0.475 \sim 0.958, P = 0.016$)。③rs10044169(A/C):在 C 显性模式下,CC 和 CA 基因型的 ISS 发病风险降低($OR = 0.649, 95\% CI: 0.424 \sim 0.993, P = 0.027$)。

表 1 GHR 基因 3 个阳性 SNP 位点的定位与基因型

Tab 1 Location and genotypes of 3 positive SNP sites in GHR gene

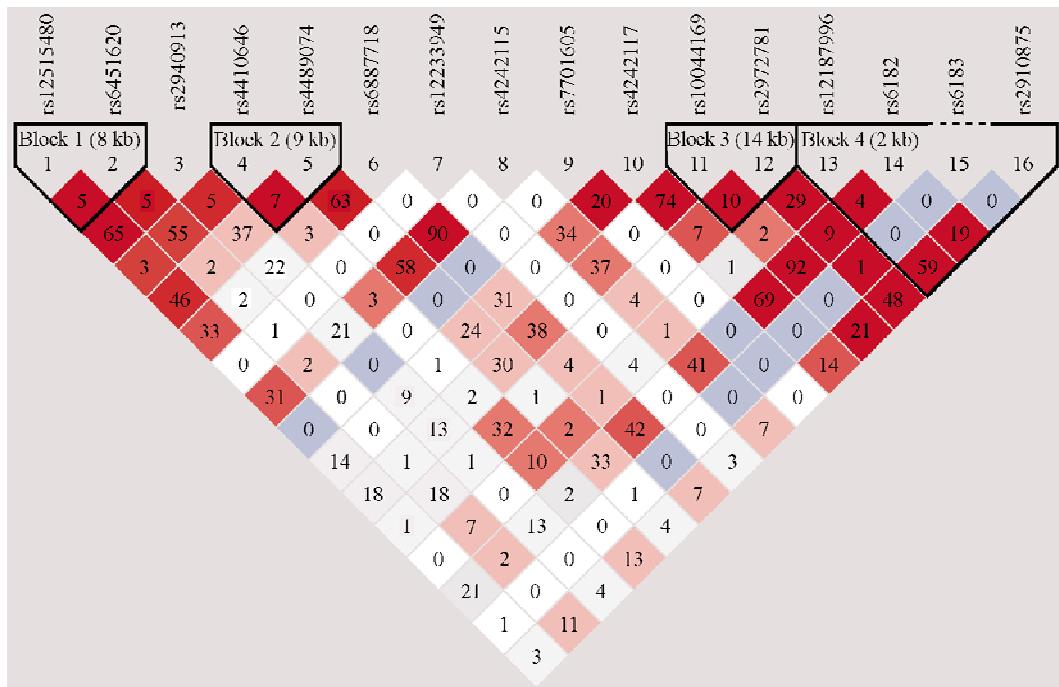
SNP 位点	定位	区域	基因型
rs6182	Chr5 42754685	Exon10	G/T
rs4410646	Chr5 42605399	Intron2	A/C
rs10044169	Chr5 42674743	Intron6	A/C

2.6 阳性 SNP 位点基因型与 ISS 相关临床变量的关系

单因素方差分析结果显示:位点 rs4410646 基因型与 ISS 患儿血清 IGF-1 质量浓度的关系接近有统计学意义($F = 3.046, P = 0.050$)(表 3)。对该位点的多因素 Logistic 回归分析结果显示:以 CC 基因型为参照,血清 IGF-1 与基因型 AA 和 CA 相关,血清 IGF-1 质量浓度越高,患儿基因型为 AA($OR = 1.011, 95\% CI: 1.002 \sim 1.020, P = 0.018$)和 CA($OR = 1.010, 95\% CI: 1.001 \sim 1.019, P = 0.037$)的可能性越大。以

AA 基因型为参照, 血清 IGF-1 与基因型 CC 相关, 血清 IGF-1 质量浓度越高, 患儿基因型为 CC 的可能性越

小($OR = 0.989, 95\% CI: 0.980 \sim 0.998, P = 0.018$); 血清 IGF-1 与基因型 CA 无关($P = 0.253$)。



注: 图中蓝色和红色方形代表 $D' = 1$ ($D' = 1$ 表示连锁完全不平衡, $D' = 0$ 表示连锁完全平衡), 其中蓝色表示 $LD < 2$, 红色为 $LD \geq 2$ (存在连锁遗传); 白色及阴影内的粉色和红色代表 $D' < 1$ (LD 程度较低); 各方格中显示的数值为 $r^2 \times 100$ ($r^2 = 0$ 表示连锁完全平衡, $r^2 = 1$ 表示连锁完全不平衡)。

图 2 GHR 基因 3 个阳性 SNP 位点 LD 结构
Fig 2 LD plot of 3 positive SNP sites in GHR gene

表 2 ISS 组和对照组阳性 SNP 位点的基因型分布特点(n)

Tab 2 Distribution of genotypes of positive SNP sites in ISS group and control group (n)

组别	rs6182	rs4410646	rs10044169
	TT + GT/GG	CC + CA/AA	CC + CA/AA
ISS 组($N = 199$)	31/168	136/63	34/165
对照组($N = 469$)	107/362	278/191	113/356

表 3 rs4410646 不同基因型与 ISS 相关临床变量的关系

Tab 3 Associations of different genotypes of rs4410646 with ISS-related clinical variables

临床变量	AA/CA/CC		CC + CA/AA	
	F	P	t	P
THt	0.773	0.463	-0.094	0.925
HtSDS	0.119	0.888	0.483	0.629
GH 激发峰值	0.831	0.438	0.901	0.369
血清 IGF-1	3.046	0.050	1.904	0.060
血清 IGFBP3	1.016	0.364	0.989	0.324

注: AA/CA/CC 指 3 种基因型间两两比较; CC + CA/AA 指 CC 和 CA 基因型与 AA 基因型比较。

3 讨 论

ISS 是一种病因不确定、非生长激素缺乏的复杂

疾病, 临床的突出表现是匀称型身材矮小。目前, 国内外研究多聚焦于 GH/IGF-1 轴, 其中 GHR 及受体后缺陷导致 ISS 已见报道。GHR 属细胞因子受体超家族成员, 是由 630 个氨基酸残基构成的单链糖蛋白, 包括胞外区、跨膜区、胞内区 3 个部分。胞外区包含与 GH 结合的位点, 同时也是 GH 结合蛋白的前体; 跨膜区较短小, 只形成一次跨膜; 胞内区是细胞信号转导的功能区。GH 与特异性 GHR 结合, 进而激活受体后信号转导系统而发挥促生长的生物学效应。

GHR 基因多态性与身高的关系已受到关注。GHR 基因 Ex3 缺失 (-d3GHR) 对身高及重组人生长激素(rhGH)助长疗效的影响有较多报道, 但结果不同。有研究^[1,2]显示: 携带 -d3GHR 的生长激素缺乏症(growth hormone deficiency, GHD)患儿 HtSDS 相对较高; 但在非 GHD 矮小者中未发现此现象。另有报道^[3], rhGH 对携带 -d3GHR 基因型 ISS 患儿及小于胎龄儿的助长疗效较好, 并由体外实验证实其信号转导效率也相应提高。对 Turner 综合征患儿的研究^[4]也发现 -d3GHR 基因对短期 rhGH 疗效有正性作用。这些研究提示 GHR 基因多态性与矮小表型

及药物疗效之间可能存在一定的关系。

国外有研究^[5]对 GH/IGF-1 轴上包括 GHR 基因在内的 8 个基因的 150 个 SNP 位点进行了大样本多态性分析,结果未发现基因多态性与成年身高相关。但该研究采用的研究对象并非正常人群,而是各类心脏病患者,在一定程度上存在代谢异常及与疾病相关基因的干扰,而且 GH/IGF-1 轴也是重要的代谢调节生物通路,故可能难以准确显示这些基因多态性与身高的关系。目前,国内尚未见针对 GHR 的 SNP 与身高或 ISS 的病例对照研究。

本研究通过对 199 例 ISS 患儿和 469 名正常对照者进行病例对照分析,发现在人 GHR 基因 Ex10 SNP 位点 rs6182 上,T 等位基因携带者的矮小风险降低,该等位基因可能与 ISS 的发病风险相关。由于 rs6182 位于 GHR 基因的 Ex10,编码 GHR 蛋白的第 440 个氨基酸残基(G→半胱氨酸,T→苯丙氨酸),接近 JAK2 的磷酸化位点 Tyr(469),因此有可能通过影响 GHR 受体后 JAK2-STAT5b 信号通路,改变 GH 作用骨骼靶器官的促生长能力,但此推测还需进一步的功能研究验证。日本一项研究^[6]对该位点的多态性与颅面骨下颌支高度进行了相关分析,发现 GG 基因型与较高的下颌支高度相关,且发现有种族特异性。本研究结果显示 T 等位基因携带者 ISS 发病风险相对较低,与日本这项研究的结果存在矛盾,这种差异可能与长骨和颅面骨成骨差异有关,确切的解释有待进一步研究。

阳性 SNP 位点 rs4410646 和 rs10044169 分别位于 Int7 及 Int2。本研究显示 rs4410646 在 C 作为显性模式下,其杂合基因型有较高的 ISS 发病风险,而且不同基因型个体的血清 IGF-1 水平存在差异。对该位点的多因素 Logistic 回归分析结果显示:以 CC 基因型为参照,AA、CA 基因型与较高的血清 IGF-1 水平相关;以 AA 基因型为参照,CC 基因型与较低的血清 IGF-1 水平相关。我国香港的一项研究^[7]对 981 名随机入选的青春期儿童进行了 rs4410646 分型,与身体成分、血压相关因素积分进行了关联分析,发现该位点的 CC 基因型与较低的 BMI、体脂含量、腰围和臀围相关。另有报道^[8-10]显示,内含子 6、7 和内含子 9 的单个碱基纯合突变能够导致 GH 不敏感的矮小表型。该结果提示 GHR 非编码区的基因多态性可能在一定程度上反映了矮小风险。

总之,本研究结果显示 GHR 在 GH 介导的促生长效应中起重要作用,人类 GHR 的基因多态性与

ISS 发病风险存在一定的关系,其中 3 个 SNP 位点可能与 ISS 的遗传易感性有关。但由于本研究的样本量相对较小,对数据的分析结果可能存在一定局限性,还需进一步扩大样本进行深入研究。

[参考文献]

- [1] Wassenaar MJ, Dekkers OM, Pereira AM, et al. Impact of the exon 3-deleted growth hormone (GH) receptor polymorphism on baseline height and the growth response to recombinant human GH therapy in GH-deficient (GHD) and non-GHD children with short stature: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, 94(10): 3721–3730.
- [2] Raz B, Janner M, Petkovic V, et al. Influence of growth hormone receptor d3 and full-length isoforms on growth hormone response and final height in patients with severe growth hormone deficiency[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93(3): 974–980.
- [3] Dos Santos C, Essioux L, Teinturier C, et al. A common polymorphism of the growth hormone receptor is associated with increased responsiveness to GH[J]. *Nat Genet*, 2004, 36(7): 720–724.
- [4] Binder G, Baur F, Schweizer R, et al. The d3-growth hormone (GH) receptor polymorphism is associated with increased responsiveness to GH in Turner syndrome and short small-for-gestational-age children[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91(2): 659–664.
- [5] Lettre G, Butler JL, Ardlie KG, et al. Common genetic variation in eight genes of the GH/IGF1 axis does not contribute to adult height variation[J]. *Hum Genet*, 2007, 122(2): 129–139.
- [6] Tomoyasu Y, Yamaguchi T, Tajima A, et al. Further evidence for an association between mandibular height and the growth hormone receptor gene in a Japanese population[J]. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 2009, 136(4): 536–541.
- [7] Mong JL, Ng MC, Guldan GS, et al. Associations of the growth hormone receptor (GHR) gene polymorphisms with adiposity and IGF-I activity in adolescents[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2010, 73(3): 313–322.
- [8] Iida K, Takahashi Y, Kaji H, et al. Growth hormone (GH) insensitivity syndrome with high serum GH-binding protein levels caused by a heterozygous splice site mutation of the GH receptor gene producing a lack of intracellular domain[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998, 83(2): 531–537.
- [9] David A, Miraki-Moud F, Shaw NJ, et al. Identification and characterisation of a novel GHR defect disrupting the polypyrimidine tract and resulting in GH insensitivity[J]. *Eur J Endocrinol*, 2010, 162(1): 37–42.
- [10] David A, Gamacho-Hübner G, Bhangoo A, et al. An intronic growth hormone receptor mutation causing activation of a pseudoexon is associated with a broad spectrum of growth hormone insensitivity phenotypes[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92(2): 655–659.