

论著·临床研究

特发性矮小患儿生长激素受体基因 *Ex3* 多态性与重组人生长激素疗效分析

陆文丽 王伟 王德芬 肖园 黄晓萍 董治兰

(上海交通大学医学院瑞金医院儿内科,上海 200025)

[摘要] 目的 观察生长激素受体(*GHR*)基因 *Ex3* 多态性与重组人生长激素(rhGH)治疗青春期前特发性矮小(ISS)疗效间的相关性。**方法** 青春期前 ISS 患儿 30 例,均采用 rhGH[0.116±0.02 IU/(kg/d)]治疗;其外周血白细胞中抽提基因组 DNA,采用多重 PCR 扩增 *GHR* 基因 *Ex3* 区域。对不同基因型患儿治疗后生长速率(GV)、年龄对应身高标准差积分(HtSDS_{CA})及骨龄对应身高标准差积分(HtSDS_{BA})、预测终身高进行比较。**结果** rhGH 治疗半年后 d3/d3 基因型组 GV 较 fl/fl 基因型组明显增加[(6.3±1.6)cm/年 vs (3.4±0.5)cm/年,*P*<0.05]。**结论** ISS 患儿 *GHR Ex3* 基因型与 rhGH 促生长疗效存在一定关联,d3/d3 等位基因型患儿用 rhGH 治疗后生长速率明显优于 fl/fl 等位基因型。[中国当代儿科杂志,2010,12(9):730-733]

[关键词] 特发性矮小;重组人生长激素;生长激素受体;儿童
[中图分类号] R72 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)09-0730-04

Relationship between the polymorphism of growth hormone receptor *Ex3* and the efficacy of rhGH treatment in children with idiopathic short stature

LU Wen-Li, WANG Wei, WANG De-Fen, XIAO Yuan, HUANG Xiao-Ping, DONG Zhi-Lan. Department of Pediatrics, Ruijin Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China (Wang W, Email: rjwangwei@yahoo.cn)

Abstract: Objective To assess the influence of growth hormone receptor (*GHR*) *Ex3* genotype on the short-term response to recombinant human growth hormone (rhGH) therapy in children with idiopathic short stature (ISS). **Methods** Thirty prepubertal children with ISS receiving rhGH treatment [0.116±0.02 IU/(kg/d)] were randomly recruited. The *GHR Ex3* locus was genotyped using a PCR multiplex assay. The growth data including growth velocity, height SDS for chronological age (HtSDS_{CA}), height SDS for bone age (HtSDS_{BA}) and predict final height were compared in children with different *GHR* genotypes 6 months after rhGH treatment. **Results** After 6 months of rhGH treatment, the children with ISS carrying d3/d3 alleles showed a significantly higher increment in growth velocity than those carrying fl/fl alleles (6.3±1.6 cm/year vs 3.4±0.5 cm/year; *P*<0.05). **Conclusions** The polymorphism in *GHR Ex3* is associated with the responsiveness to rhGH treatment, showing that the growth velocity in ISS children with d3/d3 genotype is significantly higher than those with fl/fl genotype. [Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (9):730-733]

Key words: Idiopathic short stature; Recombinant human growth hormone; Growth hormone receptor; Child

特发性矮小(idiopathic short stature,ISS)是指病因尚不明确的匀称性身材矮小,临床较常见。其身高(Ht)低于正常均值的2个标准差或第3百分位以下,出生身长及体重均正常,出生后生长速率(GV)缓慢;外周血生长激素(GH)激发峰值>10 μg/L,其他实验室检查皆无异常发现;并排除其他已知生长障碍性疾病。鉴于目前生长激素受体(*GHR*)基因与重组人生长激素(rhGH)疗效关联研究广受关注,且尚无中国人群的相关报道,故本研究就中国部分地区青春期前 ISS 患儿 *GHR* 基因的遗传

多态性与 rhGH 促生长疗效进行初步关联分析,观察 ISS 患儿 *GHR Ex3* 遗传易感性及其药物疗效的关联性,为临床个体化治疗提供初步依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象

ISS 组:30 例,男 20 例,女 10 例,平均年龄(9.4±0.4)岁,均未进入青春发育期。遴选标准包括:① Ht 低于同年龄、同性别正常儿童均值两个标准差(参照

[收稿日期]2009-07-29;[修回日期]2010-07-02
[作者简介]陆文丽,女,硕士,主治医师。
[通信作者]王伟,主任医师。

2005 年我国儿童身高标准^[1]);② $GV < 4$ cm/年;③ 出生体重及身长均正常;④ 骨龄(BA)正常或延迟;⑤ 排除其他生长缺陷疾病;⑥ 两项 GH 药物激发试验(精氨酸、可乐定)中至少 1 项 GH 峰值 > 10 ng/mL 者;⑦ 均接受 rhGH $[0.116 \pm 0.02$ IU/(kg/d),临睡前皮下注射]治疗持续 6 个月至 1 年。正常对照组:上海交通大学医学院在校健康新生 40 例,男 23 例,女 17 例,男性平均身高 (172.2 ± 6.7) cm,最高 186.0 cm,最低 161.0 cm;女性平均身高 (161.6 ± 5.2) cm,最高 173.0 cm,最低 151.0 cm。

1.2 方法

1.2.1 临床观测 每 3 个月随访 Ht、体重、第二性征发育情况,女孩盆腔子宫、卵巢 B 超,男性测睾丸容积(睾丸模具),分别于治疗前及治疗后 6 个月摄左手 BA 片,计算预测成年终身高 (PAH) 和遗传靶身高 (THt)。

1.2.2 评价 所有观察对象 Ht 均由研究者用身高测量仪测得。BA 判断用 Greulich-Pyle 法, PAH 用 Bayley-Pinneau 法。THt = (父亲身高 + 母亲身高 ± 13 cm)/2。Ht 以标准差积分 (SDS) 为参照计算单位:以 2005 年九市城区正常男女童身高资料参照值计算身高的标准差积分 (HtSDS), HtSDS = (实测身高 - 同龄身高均值)/同龄身高标准差,按年龄对应 HtSDS 表示为 HtSDS_{CA},按骨龄对应 HtSDS 表示为 HtSDS_{BA}。

1.2.3 基因分型 抽提外周血有核细胞基因组 DNA,采用多重 PCR 扩增 GHR 基因 Ex3 相关片段。所有引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成,参照 Pantel 等^[2]的方法。在 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳中可见 935 bp 和 532 bp 两种条带,前者为 *fl*-GHR 单倍型,后者为 *d3*-GHR 单倍型,图 1。

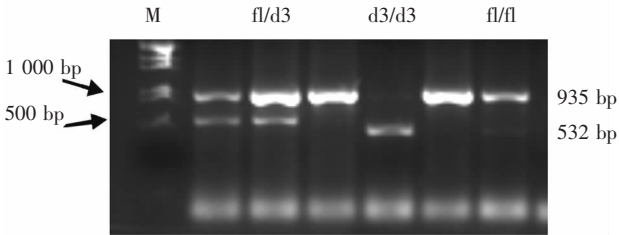


图 1 GHR 基因 Ex3 多重 PCR 结果

表 3 ISS 患儿 GHR 基因 Ex3 3 种基因型治疗 6 个月后 GV、HtSDS_{CA}、HtSDS_{BA} 的变化 ($\bar{x} \pm s$)

基因型	例数	GV0 (cm/年)	Δ GV6 (cm/年)	Δ HtSDS _{CA}	Δ HtSDS _{BA}
fl/fl	18	4.1 $\pm$ 0.9	3.4 $\pm$ 0.5	0.31 $\pm$ 0.1	-0.18 $\pm$ 0.1
fl/d3	7	3.3 $\pm$ 0.6	4.3 $\pm$ 0.8	0.33 $\pm$ 0.1	0.09 $\pm$ 0.1
d3/d3	5	3.4 $\pm$ 0.6	6.3 $\pm$ 1.6 ^a	0.53 $\pm$ 0.1	0.32 $\pm$ 0.2

a: 与 fl/fl 组比较, $P < 0.05$ 。 Δ GV6、 Δ HtSDS_{CA}、 Δ HtSDS_{BA} 表示治疗 6 个月后的差值。

1.3 统计学分析

正态数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,结果用 SPSS 11.0 软件分析,采用卡方检验及 T 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GHR 基因 Ex3 基因型分布频率分析

fl/fl、*fl/d3* 及 *d3/d3* 3 种基因型发生频率在对照组中为 65.0%、22.5% 及 12.5%;在 30 例 ISS 患儿中为 60.0%、23.3% 及 16.7%,两组在基因型构成比 ($\chi^2 = 0.282, P = 0.869$) 和等位基因频率 ($\chi^2 = 0.331, P = 0.742$) 上差异均无统计学意义,见表 1。

表 1 GHR 基因 Ex3 基因型及分布频率比较 [例(%)]

组别	例数	fl/fl	fl/d3	d3/d3
对照组	40	26 (65.0)	9 (22.5)	5 (12.5)
ISS 组	30	18 (60.0)	7 (23.3)	5 (16.7)
合计	70	44 (62.9)	16 (22.9)	10 (14.2)

2.2 ISS 患儿 GHR Ex3 基因型与相关临床参数分析

表 2 显示 ISS 患儿在治疗前的相关生长参数。所有患儿治疗前 HtSDS_{CA} 及 GV 在 3 种基因型 (*fl/fl*、*fl/d3* 及 *d3/d3*) 间差异无统计学意义 ($P > 0.05$),预测 PAH 与 THt 差值的差异亦无统计学意义。

表 2 ISS 患儿 GHR Ex3 基因型与临床特征比较 ($\bar{x} \pm s$)

基因型	例数	初治年龄 (岁)	GV0 (cm/年)	治前 HtSDS _{CA}	PAH0-THt (cm)
fl/fl	18	9.8 $\pm$ 0.5	4.1 $\pm$ 0.9	-2.4 $\pm$ 0.5	2.7 $\pm$ 2.4
fl/d3	7	9.3 $\pm$ 1.0	3.3 $\pm$ 0.6	-2.5 $\pm$ 0.5	1.7 $\pm$ 1.5
d3/d3	5	8.9 $\pm$ 0.8	3.4 $\pm$ 0.6	-2.7 $\pm$ 0.7	3.2 $\pm$ 2.5

注:GV0 表示治疗前生长速率;PAH0 表示治疗前预测成年身高

2.3 ISS 患儿 GHR Ex3 基因型与 rhGH 疗效的相关分析

表 3 显示给予 ISS 患儿 rhGH 治疗 6 个月后生长参数的变化。其中 *d3/d3* 基因型的 GV 较 *fl/fl* 基因型明显增加 ($t = 2.253, P = 0.035$),而 Δ HtSDS_{CA} 及 Δ HtSDS_{BA} 分别进行 T 检验,各组间两两比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

近年来美国食品药品监督管理局(FDA)批准 rhGH 用于非生长激素缺乏(非 GHD)所致的儿童身材矮小,其促生长疗效备受关注^[3-4]。国内外大量临床资料分析表明,在同一种疾病治疗者个体之间可以存在不同药效差异,药物敏感性似乎并非完全依赖患儿年龄、骨龄、药物剂量等因素,可能还与个体感应药物作用的遗传背景特征相关联。

个体对 rhGH 的敏感性可影响药物的促生长疗效,其中 GH 敏感性涉及 GH-IGF-1 内分泌轴及骨骺生长板等信号级联通路上的多个候选基因,这些基因的相关位点多态性与个体生长反应之间可能存在一定的联系^[5]。已知 GH 通过与 *GHR* 结合产生 IGF-1,后者直接调节骨骼生长。此外,外源性 rhGH 亦由此机制达到促生长疗效,可见 *GHR* 对人体骨骼纵向生长及 rhGH 疗效至关重要。

GHR 基因定位于第 5 号染色体(5p13-12),包含 9 个外显子(Ex),基因全长 87 kb。编码蛋白是由 620 个氨基酸残基组成的单链跨膜糖蛋白组成,膜外区、跨膜区及膜内区分别由 245、25、350 个氨基酸残基组成。根据基因转录时对 *Ex3* 的保留或删除,*GHR* 具有缺失 *Ex3* (*d3-GHR*) 和全长 *Ex3* (*fl-GHR*) 两种类型。自 2004 年以来,有关 *GHR* 这种较为罕见的遗传多态性国外已有大量观察报道,并证实存在 *d3-GHR* 及 *fl-GHR* 2 种单倍型和 *d3/d3-GHR*、*d3/fl-GHR* 及 *fl/fl-GHR* 3 种基因型。同时,在采用 rhGH 治疗的小于胎龄儿(SGA)、ISS、Turner 综合征等非 GHD 及 GHD 患儿的研究中,*d3-GHR* 与 *fl-GHR* 之间显示不同的助长疗效差异。

2003 年 8 月美国 FDA 已批准 ISS 作为 rhGH 治疗的适应证之一,这对非 GHD 的矮身材患儿无疑是带来了助长的福音。然而,人群中个体间对 rhGH 的敏感性会存在一定差异,从而影响治疗药物的促生长疗效。为避免不够理想的用药传统及提高药物效价比,有关药物敏感性的研究已逐渐受到重视,主要涉及 GH-IGF-1 轴的及骨骺生长板上的信号级联通路上的多个候选基因位点,其中 *GHR* 基因是较为关注的药物基因组学研究之一。

Pantel 等^[2]报道 1 例典型 GH 不敏感综合征(CHIS,也称 Laron 综合征)的 *GHR* 基因复合性突变。其存在两种复合 *GHR* 基因突变,分别是位于 *Ex3* 和 *Ex4* 上,*Ex4* 上的 C38X 无义突变已在文献中多次报道,但在 *Ex3* 上的突变从未见报道。在对其

双亲基因型及表型分析中发现,其母亲 *GHR* 的相关等位基因位点为 *GHRd3-wt* 和 *GHRfl-W16X*,父亲为 *GHRfl-wt* 和 *GHRfl-C38X*,父母表型均正常,身高亦达正常成人标准范围;而患儿为 *GHRfl-W16X* 和 *GHRfl-C38X*,则具有典型 GHIS 的表型,故表明无论 *GHR* 基因 *Ex3* 位点是 *fl-GHR* 或 *d3-GHR* 单倍性,其单拷贝的表达量对于正常人体生长已足够。此外,在各种病因的矮小症助长疗效观察中亦显示同样存在 *GHR* 基因 *Ex3* 多态性,其分布频率与正常对照组并无差异,提示尽管已证实 *GHR* 基因缺陷涉及 ISS 的复杂病理机制,但其 *Ex3* 的多态性对决定人体身高并无明显生物学意义。本研究发现,正常对照与 ISS 患儿 *fl-GHR* 与 *d3-GHR* 发生频率差异无统计学意义,且比较 *GHR* 基因 *Ex3* 位点 3 种基因型(*fl/fl*、*fl/d3* 及 *d3/d3*)的治疗前 Ht 及 GV 间差异也无统计学意义,预测 PAH 与 THt 的差异亦无显著性。

2004 年 Dos Santos 等^[6]发现 *GHR* 基因 *Ex3* 多态性与 ISS 患儿 rhGH 治疗敏感性之间存在一定的联系。目前已知人 *GHR* 基因 *Ex3* 具有两种单倍型,即 *d3-GHR* 和 *fl-GHR*,并可呈现 3 种基因型(*fl/fl*、*fl/d3* 及 *d3/d3*)。在较大剂量 rhGH 治疗非 GHD(如 SGA、ISS 等)矮身材患儿中,*d3-GHR* 基因型与较佳药物助长疗效相关。已有文献报道具有单拷贝或双拷贝 *d3-GHR* 等位基因者,采用 rhGH 治疗后生长加速相当于双拷贝 *fl-GHR* 等位基因型患儿的 1.7 ~ 2 倍($P < 0.0001$),表现出较好的药物敏感性^[6]。另外,在体外应用荧光素报告基因质粒转录功能实验中亦证实了 *fl-GHR* 与 *d3-GHR* 基因型的表达活性存在差异。给予不同浓度(0 ~ 50 ng/mL)的 rhGH 后,可见 *GHR* 转录活性随药物浓度递增呈线性相关,其中单拷贝或双拷贝 *d3-GHR* 较 *fl-GHR* 等位基因转录活性高出近 30% ($P < 0.0001$)。2006 年 Binder 等^[7]在 Turner 综合征和 SGA 患儿中也证实了上述观点,即 *d3-GHR* 与 rhGH 助长疗效相关。两种等位基因在 1 年 rhGH 疗程后 GV 及 PAH 均存在明显差异,但血 IGF1、IGFBP3 浓度及体重指数(BMI)等指标无明显差异。Alexander 等^[8]也在比较 3 种基因型(*fl/fl*、*fl/d3* 及 *d3/d3*)的药物助长疗效中证实,GHD 患儿采用较大剂量 rhGH 治疗 1 年后不同基因型的 GV、HtSDS 与 THtSDS 的差值均存在显著差异,*d3-GHR* 等位基因型患儿可获得较高的 PAH,提示 *d3-GHR* 等位基因具有相对强势的助长显性效应。

有关 *d3-GHR* 潜在高生物学活性的分子机制目前尚未阐明,可能与 GH-IGF-1 内分泌轴中配体分泌-受体敏感性之间平衡的一种代偿机制有关,如

rhGH 的药物敏感性可通过调节 *GHR* 的细微结构变化而影响其转录表达功能,*d3-GHR* 者受体膜外区氨基末端的第 7~28 位的氨基酸残基丢失,造成编码蛋白的 A6D 置换(天冬氨酸取代丙氨酸)。这一缺失序列并不位于受体与配体的结合部位,也未影响膜外区分子间的二硫键形成及其球形折叠的空间构型,仅引起一个糖基化位点缺失。但 A6D 可能影响某一高度保守区域,从而造成受体所带电荷及疏水性的改变,所致膜外区的精细构象变化可能使 GH 更易触发受体的活化过程。

本研究就 *GHR* 基因 *Ex3* 不同基因型的分析研究中也证实了上述结论。青春期前 ISS 患儿采用 rhGH 治疗 6 个月后,纯合 *d3-GHR*(*d3/d3*)组患儿的 GV 较纯合 *fl-GHR*(*fl/fl*)组明显增加($P=0.035$),进一步提示,*GHR* 基因型对临床预测评估 rhGH 促生长疗效的重要意义。另外,本研究观察 3 种不同基因型之间治疗后 HtSDS_{CA}变化差异尚无统计学意义,尽管数值观察存在变化,但统计学分析差异无统计学意义,此与文献报道不符,推测原因可能与治疗时间过短有关。比较 3 种不同基因型治疗前后 HtSDS_{BA}的变化显示差异无统计学意义,表明青春期前 ISS 患儿给予 GH 治疗对促进骨龄成熟并无大碍。另外,本研究观察到 *fl/d3* 组较 *fl/fl* 间各生长参数的差异无统计学意义,其原因尚不明确,有关确切的结论尚有待进一步深入研究。

[参 考 文 献]

[1] 国家体育总局群体司编. 2000 年国民体质监测报告[M]. 北京:体育大学出版社, 2002: 105,124.

[2] Pantel J, Grulich-Henn J, Bettendorf M, Strasburger CJ, Heinrich U, Amselem S. Heterozygous nonsense mutation in exon 3 of the growth hormone receptor (*GHR*) in severe GH insensitivity (*Laron syndrome*) and the issue of the origin and function of the *GHRd3* isoform[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88(4): 1705-1710.

[3] Hintz RL, Attie KM, Baptista J, Roche A. Effect of growth hormone treatment on adult height of children with idiopathic short stature[J]. *N Engl J Med*, 1999, 340(7): 502-507.

[4] Bryant J, Baxter L, Cave C, Milne R. Recombinant growth hormone for idiopathic short stature in children and adolescents[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2003: CD004440.

[5] Thomas FJ, McLeod HL, Watters JW. Pharmacogenomics: the influence of genomic variation on drug response[J]. *Curr Top Med Chem*, 2004, 4(13): 1399-1409.

[6] Dos Santos C, Essioux L, Teinturier C, Tauber M, Goffin V, Bougneres P. A common polymorphism of the growth hormone receptor is associated with increased responsiveness to growth hormone[J]. *Nat Genet*, 2004, 36(7): 720-724.

[7] Binder G, Baur F, Schweizer Ranke MB. 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.

[8] Alexander AL, Frederico G, Marchisotti LR, Luciani RC, Berenice BM, Ivo JP. Growth hormone (GH) pharmacogenetics: influence of GH receptor exon 3 retention or deletion on first-year growth response and final height in patients with severe GH deficiency[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91(3): 795-796.

(本文编辑:徐福兰)