

论著·临床研究

特发性矮小患儿胰岛素样生长因子受体基因单核苷酸多态性研究

黄慧¹ 杨玉¹ 王伟² 杨利¹ 谢理玲¹ 王莹³ 卫海燕⁴

(1. 江西省儿童医院内分泌科, 江西 南昌 330006; 2. 上海交通大学附属瑞金医院内分泌科, 上海 200023; 3. 国家人类基因组南方研究中心, 上海 201209; 4. 郑州市儿童医院内分泌科, 河南 郑州 450053)

[摘要] 目的 探讨胰岛素样生长因子-I受体(IGF-IR)基因单核苷酸多态性(SNP)与特发性矮小(ISS)的发病危险的相关性。方法 2008~2011年确诊为ISS患儿804例,正常对照组575例,用Snapshot法检测两组IGF-IR基因相关位点SNP。结果 两组rs1976667基因型分布频率差异无统计学意义($P>0.05$);rs1976667 A等位基因分布频率较正常对照组高,差异有统计学意义($P<0.01$)。结论 IGF-IR基因rs1976667位点等位基因A是ISS发病的危险因素。 [中国当代儿科杂志,2011,13(12):955-958]

[关键词] 特发性矮小; 胰岛素样生长因子受体; 单核苷酸多态性; 儿童

[中图分类号] R725.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)12-0955-04

Association between single nucleotide polymorphism of insulin-like growth factor receptor gene and idiopathic short stature

HUANG Hui, YANG Yu, WANG Wei, YANG Li, XIE Li-Ling, WANG Ying, WEI Hai-Yan. Department of Endocrinology, Children's Hospital of Jiangxi Province, Nanchang 330006, China (Yang Y, Email: yangyu5168@126.com)

Abstract: Objective To study the association between single nucleotide polymorphism (SNP) of insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) gene and idiopathic short stature (ISS). **Methods** A total of 804 children with ISS and 575 normal controls were recruited from 2008 to 2011. IGF-IR gene SNP was genotyped using the Snapshot Multiplex System. **Results** The distribution frequency of genotype rs1976667 showed no significant difference between the ISS and the control groups, while that of the allele A of rs1976667 was significantly higher in the ISS group than in the control group ($P<0.01$). **Conclusions** The allele A at rs1976667 SNP of IGF-IR gene is a risk factor for ISS.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13 (12):955-958]

Key words: Idiopathic short stature; Insulin-like growth factor receptor; Single nucleotide polymorphism; Child

矮小症(short stature)指在相似环境下身高较正常同年龄、同性别、同种族的人群身高均值低2个标准差(-2 SD)或在第3百分位数以下,发病率约为2.5%,其中,特发性矮小(idiopathic short stature, ISS)占60%~80%^[1]。发病机制尚未完全阐明。

生长激素-胰岛素样生长因子轴(growth hormone-insulin-like growth factor axis)是调节儿童生长发育中最重要的神经内分泌轴^[2]。研究显示,生长激素受体(growth hormone receptor, GHR)、矮小同源盒(short stature homeobox containing, SHOX)基因与中国ISS发生有关,且不同基因型与ISS患儿的生长激素(GH)疗效有关^[3-4]。胰岛素样生长因子-I受体(IGF-I receptor, IGF-IR)是调节该轴的激素受

体级联反应的效应分子。临床研究显示,ISS存在GH不敏感、IGF-I抵抗等现象^[5],都提示可能与IGF-IR异常有关。

国内外尚无对ISS患儿的IGF-IR基因的研究,本研究通过对2008~2011年804名ISS患儿进行IGF-IR的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)研究,以期发现与ISS发病相关的易感基因,为ISS病因诊断提供依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 ISS组 2008~2011年在江西省儿童医

[收稿日期]2011-06-19; [修回日期]2011-08-09

[作者简介]黄慧,女,硕士,住院医师。

[通信作者]杨玉,主任医师。

院、上海瑞金医院、郑州市儿童医院儿科内分泌科确诊 ISS 的患儿共 804 例,其中,男孩 526 例,平均年龄 9.8 ± 3.4 岁,女孩 268 例,平均年龄 9.1 ± 3.1 岁。ISS 组纳入标准^[2]:(1)身高低于同年龄、同性别儿童 -2 SD;(2)GH 药物激发试验(精氨酸和可乐定)中,至少 1 项 GH 峰值 > 10 ng/mL;(3)血常规、甲状腺功能、肝肾功能等均无异常;(4)出生体重及身长在正常范围;(5)排除其他遗传代谢性、染色体异常、先天性骨骼异常或慢性疾患。

1.1.2 正常对照组 2008 ~ 2009 年上海交通大学及华东理工学院研究生及本科生新生(年龄均大于 18 岁)共 575 例(男 289 例,女 286 例)。入选标准:(1)身高在同性别正常人的 ± 2 SD 之间(男 > 162 cm,女 > 152 cm);(2)体重指数(BMI)范围为 17 ~ 23。均为汉族,无血缘关系。

1.2 方法

1.2.1 主要材料 Centrifuge 5415D 台式离心机(Eppendorf), Nanodrop 核酸蛋白测定仪 ND1000DNA, Snapshot 平台所需相关试剂。

1.2.2 基因组 DNA 提取 抽取 ISS 组和对照组空腹静脉血 2 mL,乙二胺四乙酸二钾抗凝,按常规酚氯仿-异戊醇法提取基因组 DNA, -20°C 冰箱保存备用。

1.2.3 候选基因 SNP 位点的筛查 根据连锁不平衡的标签 SNP 策略,通过对少量标签 SNP 的分型,可以最大程度的覆盖所有 SNP 位点。由国际 HapMap 数据库、美国国立生物技术信息中心(national center for biotechnology information,NCBI)公布的我国北京汉族人群(Han Chinese in Beijing,China,CHB)亚群 SNP 频率选择标签 SNP 位点。最终选定 46 个优化标签 SNP 位点,即 rs4966007, rs4966010, rs1574213, rs1319859, rs1976667, rs4966015, rs907813, rs11857366, rs4966017, rs932071, rs4965430, rs7183706, rs2175800, rs7183655, rs11855223, rs8041224, rs8037855, rs907801, rs12908948, rs3759908, rs6598554, rs7181123, rs8030473, rs2684761, rs4246340, rs1398873, rs1879612, rs8030950, rs12594847, rs2684781, rs1521480, rs11630259, rs12593291, rs4966038, rs2684811, rs2715416, rs7168671, rs2139924, rs2272037, rs7169544, rs4966039, rs3784604, rs2684808, rs3743262, rs2002880, rs2684788。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 ,初筛阶段,发现 rs1976667 及 rs2684788 两个位点与 ISS

有关,针对此两个位点进一步扩大样本验证。rs1976667 位点上游引物:5'-GGTGGGTTGGTCCAG-TAAA-3',下游引物:5'-CCGGGGATCTTAAGGT-CATT-3',PCR 产物长度:336 bp,SNP 探针:5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTCTACTCCAAGGCAAAGC-CAA-3';rs2684788 位点上游引物:5'-CCATAT-GAACGTCCTTGCT-3',下游引物:5'-CCAGGGAC-CTGCTGTAGAAC-3';PCR 产物长度:286 bp;SNP 探针:5'-TTTTTTTTTGTAGGTGTAGGTGACCCCT-TGGAATAA-3'。

1.2.4 SNP 位点基因分型 SNP 位点基因分型采用 Snapshot 技术平台(Applied Biosystems,ABI 公司),针对不同突变位点设计不同长度的引物 Snapshot 反应后,产物通过电泳分离、五色荧光检测、GeneMapper 分析,可在一次电泳胶内检测多个 SNP 位点。基本原理遵循了 DNA 直接测序中的双脱氧终止法,所不同的是 PCR 反应中只有不同荧光标记的 ddNTP。由于每个 SNP 位点的引物 3'端都紧靠 SNP 点,因此每一种引物在聚合酶作用下,根据模板的序列,只延伸一个核苷酸。然后用荧光检测系统检测延伸的那个核苷酸的种类。Snapshot PCR 循环条件为:96°C 10 s \rightarrow [96°C 10 s \rightarrow 50°C (53°C) 5 s \rightarrow 60°C 30 s] $\times 25$ 循环 \rightarrow 60°C 30 s \rightarrow 4°C。PCR 扩增总体积为 5 μL ,反应液成分为 1.3 μL dH₂O,1.2 μL Pooled Primers,2 μL Pooled PCR Products,0.5 μL Reaction Mix。IGF-IR 基因 rs1976667 及 rs2684788 位点 SNP 测序结果应用 GeneMapper 4.0 软件进行分析。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 16.0 软件进行统计学分析,基因型频率用非参数 logistic 分析,等位基因频率的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律

rs1976667 位点 SNP 等位基因频率在人群中的分布符合 Hardy-Weinberg 遗传平衡定律($P = 0.33$)。rs2684788 位点 $P < 0.001$,不符合遗传平衡定律,故去除该位点。

2.2 IGF-IR 基因 rs1976667 位点 SNP 与 ISS 相关性

ISS 组和对照组的 rs1976667 基因分布频率比较,显示两组基因型分布频率差异无统计学意义($P > 0.05$);A/G 等位基因分布频率比较差异有统

计学意义 ($OR = 3.917, 95\% CI = 3.11 \sim 4.931$), 提示 rs1976667 等位基因 A 是 ISS 发病的危险因素, 其

患病风险是等位基因 G 的 3.917 倍。见表 1。

表 1 rs1976667 基因型及等位基因的病例/对照分析 [例(%)]

组别	例数	基因型			等位基因	
		AA	AG	GG	A	G
对照组	575	299 (52.0)	228 (39.7)	48 (8.3)	413 (39.4)	162 (60.6)
ISS 组	804	407 (50.6)	330 (41.0)	67 (8.4)	317 (71.8)	487 (28.2)
χ^2 值			0.285			141.2
P 值			>0.05			<0.01
OR 值		1.000	1.025	1.063	3.917	1.000
95% CI		—	0.688 ~ 1.529	0.849 ~ 1.332	3.11 ~ 4.931	—

3 讨论

目前普遍认为, 身高受与内部和外部环境交互影响的多种遗传和表观遗传的调节^[2]。人的身高的遗传度约为 80%^[6], 遗传因素是影响身高个体差异的主要因素。成年身高和生长节律很大程度上都是受基因编码调控。儿童的生长被认为可能是“身高基因”和“节律基因”调控的结果。

身高的线性增长受营养代谢轴和下丘脑 GH-IGF 轴的调节。其中 GH-IGF 轴被认为是影响生长发育最重要的内分泌通路, 该轴在任何水平出现异常都有可能引起矮小的发生。根据该轴受损水平不同, 矮小可分为以下几类^[7]: (1) 原发性 GH-IGF 轴缺陷: GHR 缺陷 (细胞外膜、跨膜区、细胞内膜突变); GH 信号转导缺陷 (STAT2, STAT5b); SHP-2 (由 PTPN11 编码), K-RAS, H-RAS 突变; IGF-I 基因突变或缺失; 无生物效应的 IGF-I; 酸不稳定亚基 (ALS, acid-labile subunit) 缺陷; IGF-IR 缺陷; (2) 继发性 GH-IGF 轴缺陷: 下丘脑或垂体异常引起的原发性 GH 缺陷; GH 基因缺失引起的 GH 中性抗体; 无生物学效应的 GH; (3) 获得性 GH-IGF 轴缺陷: 营养不良、肝实质性疾病、1 型糖尿病、分解代谢状态、慢性炎症、营养性疾病 (克罗恩病、青少年慢性关节炎)。

IGF-IR 基因定位于 15q26.3, 长约 315 kbp, 包含 21 个外显子, 20 个内含子^[8]。IGF-IR 属于胰岛素受体家族, 是一种跨膜多亚基酪氨酸激酶受体, 由 2 个 α 亚基和 2 个 β 亚基通过二硫键连接所构成的异四聚体 ($\alpha_2\beta_2$) 组成, 与胰岛素受体有高度同源性, 可以与胰岛素受体形成混合受体^[9]。IGF-IR 分子由膜外区、跨膜区及膜内区三个部分组成, 细胞质部分包括结构域、信号分子和效应分子三个部分, 通

路及信号分子组成复杂^[10]。

GH-IGF-I 轴在 ISS 发病中起重要作用, 该轴在任何水平发生异常都有可能引起矮小。IGF-IR 是调节该轴的激素受体级联反应的效应分子, IGF-I 必须与 IGF-IR 结合才能使靶组织发挥调节生长发育的作用。国外已有动物及临床试验研究显示, IGF-IR 基因突变可引起矮小。大鼠的 IGF/IGF-IR 敲除模型提示, IGF-IR 基因缺失后可表现出宫内生长迟缓和围产期胎儿死亡^[11-12]; 在对德国和美国的小于胎龄儿 (SGA) 的筛查中发现了首例人 IGF-IR 突变^[13]。目前已经确认 IGF-IR 突变显示可影响 IGF-IR 效应的多个阶段^[8, 13-15], 如合成、信号接收、信号转导等, 但目前尚无基因转录及 mRNA 翻译或稳定性的突变描述。IGF-IR 突变可导致 IGF-IR 单倍体不足、影响细胞内信号传递、受体加工受损、配体结合干扰、信号跨膜干扰、酪氨酸激酶缺陷等功能受损^[8, 16-17]。临床研究发现, IGF-IR 突变可引起宫内发育迟缓、SGA^[8, 15, 18]。Fang 等^[19]对一例家族性矮小病例研究发现, 存在因 IGF-IR 基因无义介导的 mRNA 降解导致 IGF-IR 蛋白单倍体不足。Roldan 等^[20]发现 IGF-IR 基因多态性与青春期女孩阴毛早现有关。IGF-IR 参与众多复杂的信号通路, 如软骨内成骨信号通路^[21-22], 都说明 IGF-IR 与生长发育密切相关。

本研究通过对 804 名已确诊的 ISS 患儿进行 SNP 检测, 发现 rs1976667 与 ISS 易感性有关。rs1976667 不同基因型、显隐性模式与 ISS 无相关性; ISS 组与对照组 A/G 等位基因分布频率比较差异有统计学意义, rs1976667 等位基因 A 的 ISS 发病风险是等位基因 G 的 3.917 倍。这可能与 rs1976667 位点 A 等位基因合成 IGF-IR 蛋白分子功能在 IGF-IR 与 IGF-I 结合的相关作用有关, 尚无 rs1976667 位点合成氨基酸的相关研究。因此, 需进

一步进行 *IGF-IR* 基因 rs1976667 位点功能检测后, 才能明确等位基因 A 与 ISS 易感性的关系。

本研究从 GH-IGF-I 轴分子遗传学角度探讨 ISS 发病机理, 研究筛选与 ISS 遗传易感性相关的 SNP 位点, 分析 *IGF-IR* 基因 SNP 与 ISS 遗传易感性的关系, 揭示其在 ISS 发病中的作用, 为发现 ISS 致病基因提供方向。

[参 考 文 献]

[1] Cohen P, Rogol AD, Deal CL, Saenger P, Reiter EO, Ross JL, et al. Consensus statement on the diagnosis and treatment of children with idiopathic short stature: a summary of the Growth Hormone Research Society, the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society, and the European Society for Paediatric Endocrinology Workshop[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93(11):4210-4217.

[2] Wit JM, Clayton PE, Rogol AD, Savage MO, Saenger PH, Cohen P. Idiopathic short stature: definition, epidemiology, and diagnostic evaluation[J]. *Growth Horm IGF Res*, 2008, 18(2):89-110.

[3] 陆文丽, 王伟, 王德芬, 肖园, 黄晓萍, 董治兰. 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[J]. *中国当代儿科杂志*, 2010, 12(9):730-733.

[4] 董治亚, 杜晓飞, 王伟, 覃克难, 肖园, 王德芬. 特发性矮小症患者 SHOX 基因启动子突变的功能分析[J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2009, 25(2):147-149.

[5] Cohen P, Germak J, Rogol AD, Weng W, Kappelgaard AM, Rosenfeld RG. Variable degree of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) sensitivity in children with idiopathic short stature compared with GH-deficient patients: evidence from an IGF-based dosing study of short children[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(5):2089-2098.

[6] Lettre G. Genetic regulation of adult stature[J]. *Current Opin Pediatr*, 2009, 21(4):515-522.

[7] Savage MO, Burren CP, Rosenfeld RG. The continuum of growth hormone-IGF-I axis defects causing short stature: diagnostic and therapeutic challenges[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2010, 72(6):721-728.

[8] Klammt J, Kiess W, Pfaffle R. IGF-IR mutations as cause of SGA[J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2011, 25(1):191-206.

[9] 王蕊, 黄昆. 胰岛素受体家族的结构与功能[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2009(12):1102-1109.

[10] Lawrence MC, McKern NM, Ward CW. Insulin receptor structure and its implications for the IGF-I receptor[J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2007, 17(6):699-705.

[11] Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A. Role of insulin-

like growth factors in embryonic and postnatal growth[J]. *Cell*, 1993, 75(1):73-82.

[12] Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (IGF-I) and type I IGF receptor (IGF-IR)[J]. *Cell*, 1993, 75(1):59-72.

[13] Abuzzahab MJ, Schneider A, Goddard A, Grigorescu F, Lautier C, Keller E, et al. IGF-I receptor mutations resulting in intrauterine and postnatal growth retardation[J]. *N Engl J Med*, 2003, 349(23):2211-2222.

[14] Duan C, Ren H, Gao S. Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins: roles in skeletal muscle growth and differentiation[J]. *General Comparative Endocrinol*, 2010, 167(3):344-351.

[15] Klammt J, Pfaffle R, Werner H, Kiess W. IGF signaling defects as causes of growth failure and IUGR[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2008, 19(6):197-205.

[16] Krus T, Klammt J, Galli-Tsinopoulou A, Wallborn T, Schlicke M, Muller E, et al. Heterozygous mutation within a kinase-conserved motif of the insulin-like growth factor I receptor causes intrauterine and postnatal growth retardation[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(3):1137-1142.

[17] Wallborn T, Wuller S, Klammt J, Krus T, Kratzsch J, Schmidt G et al. A heterozygous mutation of the insulin-like growth factor-I receptor causes retention of the nascent protein in the endoplasmic reticulum and results in intrauterine and postnatal growth retardation[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2010, 95(5):2316-2324.

[18] Ester WA, Hokken-Koelega AC. Polymorphisms in the IGF-I and IGF-IR genes and children born small for gestational age: results of large population studies[J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2008, 22(3):415-431.

[19] Fang P, Schwartz ID, Johnson BD, Derr MA, Roberts CT, Hwa V, et al. Familial short stature caused by haploinsufficiency of the insulin-like growth factor I receptor due to nonsense-mediated messenger ribonucleic acid decay[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2009, 94(5):1740-1747.

[20] Roldan MB, White C, Withel SF. Association of the GAA 1033→GAG polymorphism of the insulin-like growth factor-I receptor (IGF-IR) gene with premature pubarche[J]. *Fertil Steril*, 2007, 88(2):410-417.

[21] Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(1):46-62.

[22] Belluocci D, Bernardo BC, Rowley L, Bateman JF. A microarray approach for comparative expression profiling of the discrete maturation zones of mouse growth plate cartilage[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1779(5):330-340.

(本文编辑:王庆红)