

中国汉族人群 AR 基因多态性与男性尿道下裂的相关性研究

沈晓伟¹ 徐卯升¹ 林厚维¹ 方晓亮¹ 徐国锋¹ 唐耘熲² 耿红全¹

【摘要】 目的 研究中国汉族人群中雄激素受体基因(AR)第一外显子上的(CAG)_n多态性与男性尿道下裂发病风险的相关性。**方法** 研究对象为342例男性尿道下裂患儿以及351例健康人。从外周血淋巴细胞中提取全基因组DNA,对AR基因上的第一外显子(CAG)_n进行PCR扩增,扩增产物以Sanger测序方法对其测序,计算各样本的(CAG)_n分布情况。采用卡方检验(Chi-square test)比较病例组与对照组之间的(CAG)_n分布,并分析(CAG)_n对男性尿道下裂发病风险的影响。**结果** 病例组(CAG)_n为15~44,平均长度 23.65 ± 3.36 ;对照组为19~31,平均长度 23.14 ± 1.87 ,两组CAG重复序列有明显统计学差异($P=0.013$)。当 $n \geq 23, 24, 25, 26$ 时,尿道下裂发病风险分别为 $1.47 (CI: 1.081 \sim 2.001)$, $1.356 (CI: 1.004 \sim 1.830)$, $1.484 (CI: 1.063 \sim 2.071)$, $1.565 (CI: 1.034 \sim 2.369)$,各组均有明显统计学意义($P < 0.05$);而当 $n \leq 19$ 时,尿道下裂患病风险为 $2.111 (CI: 0.935 \sim 4.767)$, $P = 0.05$ 。**结论** AR基因第一外显子上的(CAG)_n与男性尿道下裂发病有明显的相关性,CAG重复序列越长,尿道下裂的发病风险越高。

【关键词】 尿道下裂;受体,雄激素;基因;研究

The CAG repeat polymorphism in the Androgen Receptor gene regulates the risk of hypospadias in ChineseHan population. SHEN Xiao-wei, XU Mou-sheng, LIN Hou-xiong, et al. 1, The Department of Pediatric Surgery, Xin Hua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China. 2, The Department of Pediatric Surgery, Sichuan province People's Hospital, Chengdu 610072, China

【Abstract】 Objective To analyze the risk for hypospadias in Han Chinese modified by the CAG repeat polymorphism in the exon 1 of Androgen Receptor gene. **Methods** DNA was extracted from peripheral blood samples which came from 342 cases with hypospadias and 351 healthy voluntary anonymous blood sample donors. The CAG repeat lengths were amplified with PCR, which were calculated the difference between the hypospadias and control group using Chi-square test. **Results** The mean length of CAG in hypospadias was 23.65 ± 3.36 (range 15~44), and it was 23.14 ± 1.87 (range 19~31) in control group. A significant increase of the CAG repeat length in hypospadias group was detected when compared with the controls ($P = 0.013$). In addition, the odds ratios between the hypospadias and controls revealed that the hypospadias cases are about 1.5 times to have longer CAG repeats than a shorter length for each repeat length investigated. **Conclusion** We have investigated a large number of hypospadias cases with regards to the CAG repeat length, and we provided evidence that a higher number of the CAG repeat sequence in the AR gene have a clear effect on the risk of hypospadias in Han Chinese.

【Key words】 Hypospadias; Receptors, Androgen; Genes; Research

雄激素及其受体在男性阴茎及尿道的发生发育中起着重要作用,雄激素受体(AR)基因也被认为是尿道下裂的候选基因之一。雄激素受体基因第一外

显子中CAG重复序列的长度多态性被认为与前列腺癌等疾病的发病风险相关^[1]。对高加索人群的研究也显示,AR第一位外显子区的(CAG)_n重复数升高导致了尿道下裂发病风险增加。但未见汉族人群的相关报道,考虑到AR基因第一位外显子区的(CAG)_n多态性存在明显的种族差异,本研究以中国汉族人群为研究对象,探讨AR基因第一外显子区的(CAG)_n多态性对尿道下裂发病风险的影响。

doi:10.3969/j.issn.1671-6353.2014.04.003

作者单位:1,上海交通大学医学院附属新华医院儿外科(上海市,200092);2,四川省人民医院儿外科(四川省成都市,610072),通讯作者:耿红全,唐耘熲, E-mail: ghongquan@hotmail.com, tangyunman@126.com。基金项目:国家自然科学基金项目(项目号81170639)。

材料与方法

一、临床资料

选择 342 例尿道下裂患儿,分别来自新华医院小儿外科及四川省人民医院小儿外科,家长均自愿参加本研究并签署知情同意书。所有患儿术前均明确诊断为单纯尿道下裂,不合并先天性心脏病等其它畸形,同卵双胎均为尿道下裂者只任选其中 1 例,尿道下裂家者患儿均未列入本研究。病例组年龄 9 个月至 10 岁。对照组 351 例,均为正常男性,年龄为 20~30 岁。所有病例组及对照组均为无血缘关系的汉族人群。本研究经上海交通大学医学院附属新华医院伦理委员会审核并获得批准。

二、全血 DNA 提取

采用 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司)提取各血样本中白细胞全基因组 DNA,采用分光光度计检测所提取的 DNA 样本纯度及浓度。

三、目的片段扩增及测序

采用 Primer Premier 5.0 软件针对 AR 基因第一外显子区 CAG 短重复序列区进行引物设计,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,其扩增区域为一个包括 AR 基因外显子 1 区(CAG)_n 的片段,长度为 343 bp。

正义引物 Forward: 5' - TAGGGCTGG-GAAGGGTCTAC-3'

反义引物 Reverse: 5' - GGCTGTGAAGGTTGCT-

GTTC-3'

PCR 反应条件如下:10 μL 反应体积,一次加入 1 μL loading buffer (10 ×),0.8 μL, dNTP,引物各 0.4 μL,ddH₂O 6.4 μL,最后加入 0.5 μL Taq DNA 聚合酶。扩增条件:96 °C 预变性 5 min 后进入循环,96 °C 变性 30 s,69 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,30 个循环后,72 °C 下延伸 10 min。扩增产物电泳 15 min(1% 琼脂糖凝胶、电压 150 V),自动凝胶成像仪上观察并照相,分子量标准为 TAKARA DL2000。随后将 PCR 纯化、测序(华大基因公司),确定重复序列的长度。

四、统计学方法

数据处理均采用 SPSS 19.0 统计软件。两组间重复序列数采用单因素 ANOVA 检验,并将患者及对照组(CAG)_n 重复频率采用连续分割点法分为 ≤19、≥21、≥22、≥23、≥24、≥25、≥26 七组,采用卡方检验(CAG)_n 进行尿道下裂的风险评估, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、AR 基因 CAG 重复序列长度

病例组(CAG)_n 为 15~44,平均长度 23.65 ± 3.36 ;对照组为 19~31,平均长度 23.14 ± 1.87 (图 1)。两组 CAG 重复序列有明显统计学差异($P = 0.013$)。

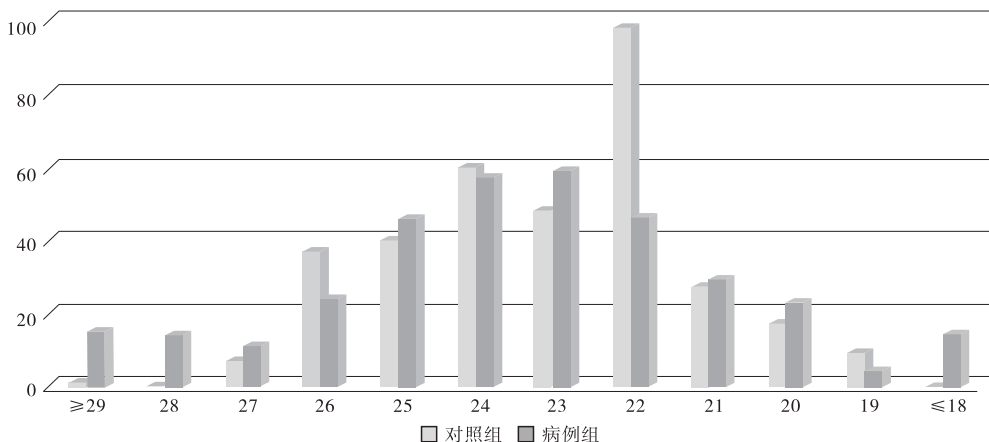


图 1 CAG 短重复序列分布图

Fig. 1 CAG short repetitive sequence distribution

二、AR 基因(CAG)_n 对尿道下裂患病风险的评估

两组采用连续分割点法分为 ≤19、≥21、≥22、≥23、≥24、≥25、≥26 七组,卡方检验分析结果见

表 1。具有较长的 CAG 重复序列者($n \geq 23$)具有较高的患尿道下裂风险,OR(Odds Ratio) = 1.471(CI: 1.081 ~ 2.001),差异有显著统计学意义($P = 0.009$)。当 CAG 重复数超过 24 时,其患尿道下裂

的风险亦逐步增加,差异均有统计学意义。具有较短的 CAG 重复数者,其患尿道下裂的风险亦明显增高,但差异无统计学意义($P=0.05$)。

表 1 AR 基因(CAG)n 对尿道下裂患病风险的评估(例)
Table 1 AR gene to evaluate the risk of hypospadias (Example)

CAG 重复数	病例组	对照组	OR(95% CI)	P 值
≤19	18	9	2.111 (CI:0.935 ~ 4.767)	0.05
≥20	324	342	—	—
≥21	301	325	0.587 (CI:0.351 ~ 0.984)	0.028
≥22	272	298	0.691 (CI:0.467 ~ 1.024)	0.04
≥23	226	200	1.471 (CI:1.081 ~ 2.001)	0.009
≥24	167	145	1.356 (CI:1.004 ~ 1.830)	0.028
≥25	110	85	1.484 (CI:1.063 ~ 2.071)	0.012
≥26	64	45	1.565 (CI:1.034 ~ 2.369)	0.021

* OR;Odds Ratio;95% CI;95% confidence interval limit

讨论

胚胎时期,男性尿道的形成及分化是一个极为复杂的过程,受多种基因的调控,如胚胎早期的非激素相关基因(Shh、FGF、BMP、HOX、Wnt 等)及晚期的激素相关基因(AR、SRD5A2、HSD17B3、FKBP52、MAMLD1、ATF3 等)^[2]。以上任何一个基因突变均可能导致尿道下裂。

AR 基因主要在胚胎后期阴茎发育的激素依赖阶段起主导作用,其编码的 AR 与雄激素结合后,促进胚胎整个尿道板由背侧向腹侧融合,此过程也存在尿生殖褶的融合,他们共同形成管状尿道。因此,AR 基因也被国内外学者认为是导致尿道下裂的候选基因之一。AR 基因定位于 X 染色体(Xq11.2 ~ 12),主要包含 8 个外显子和 7 个内含子,全长约 90 kb。该基因突变可影响 AR 的活性,从而导致完全性雄激素不敏感综合征或不完全性雄激素不敏感综合征,也有报道称该基因突变与单纯性尿道下裂有关^[3-6]。

AR 基因第一外显子区存在着两个短重复序列,即(CAG)n 和(GGN)n,他们分别编码多聚谷氨酰胺以及多聚甘氨酸。这两重复序列的长度有着明显的族群差异^[7,8]。据国外学者统计,(CAG)n 可从 6 ~ 39 个不等^[9]。已有多种疾病被证实与 AR 基因第一外显子区(CAG)n 的多态性相关,如较短的 CAG 重复数与前列腺癌、多囊卵巢综合征及隐睾等疾病的发病相关,而较长的 CAG 重复数可能与男性不育有关^[13-17]。Adamovic T 等首次在 211 例高加

索人种的尿道下裂患儿及 208 例正常男性对比研究中发现该区域较长的 CAG 重复数可增加患尿道下裂的风险^[16]。而 Asschim EL 等在高加索人种中研究时,通过对 51 例尿道下裂患儿、23 例隐睾患儿以及 210 例正常对照组进行对比后发现,(CAG)n 的长度与尿道下裂的发病并无明显关系,而 AR 基因外显子 1 区的另一个重复序列——(GGN)n 与隐睾及尿道下裂的发病有关^[7]。然而,以上研究病例数均较少,且病例数与对照组例数相差过大。本研究通过对 342 例汉族人群的尿道下裂及 351 例正常汉族男性进行(CAG)n 观察研究,结果发现病例组中携带有较长 CAG 重复序列($n \geq 23$)的人数为对照组的 1.3 ~ 1.5 倍,差异有明显统计学意义。表明长的(CAG)n 提升了中国汉族人群尿道下裂的发病风险。

有研究显示,AR 基因的转录活性可随着 CAG 重复序列的延长而逐渐下降,即雄激素受体的活性与该区域所编码的多聚谷氨酰胺的长度成负相关^[10];然而,Nenonen 等^[11]体外实验提示,AR 的活性与(CAG)n 的长度并非呈线性相关,当 $n=22$ 时,AR 的活性最高,而当 $n=16$ 或 $n=28$ 时,AR 的活性均低于 $n=22$ 时。此外,亦有文献报道该区域的(CAG)n 与男性体内雄激素水平呈正相关^[12]。本研究发现,CAG 重复序列越长,患尿道下裂的风险逐渐增高;而当 CAG 重复序列小于 19 时,尿道下裂的患病风险亦增高($OR:2.11$),但差异无统计学意义($P=0.05$)。考虑到本研究中 $n \leq 19$ 的病例组为 18 例,对照组仅 9 例,即使 P 值为 0.05,但较高的 OR 值(2.11)还是应该引起重视。在今后的研究中,进一步大幅度增加样本量才有可能明确较短的 CAG 重复序列是否导致尿道下裂发病风险提高。另外,在该研究中,如将尿道下裂组进行轻、中、重分型后,再按照连续分割法分类后进行卡方检验,由于患者组与对照组之间的人数差别较大,所得结果误差亦较大,故本研究中未予讨论。

综上,AR 基因第一外显子上(CAG)n 与中国汉族人群男性尿道下裂发病有明显的相关性,CAG 重复序列越长,尿道下裂的患病风险越高。

参考文献

1 Yong EL, Lim J, Qi W, et al. Molecularbasis Of androgen receptor disease[J]. J Ann Med,2000,32(1): 15-17.
2 Kojima Y, Kohri K, Hayashi Y. Genetic pathway of external

- genitalia formation and molecular etiology of hypospadias [J]. J Pediatr Urol, 2010, 6: 346–354.
- 3 Alléra A, Herbst MA, Griffin JE, et al. Mutations of the androgen receptor coding sequence are infrequent in patients with isolated hypospadias[J]. J ClinEndocrinolMetab, 1995, 80: 2697–2699.
- 4 Sutherland RW, Wiener JS, Hicks JP, et al. Androgen receptor gene mutations are rarely associated with isolated penile hypospadias[J]. J Urol, 1996, 156: 828–831.
- 5 Wang Y, LI Q, XU J, et al. Mutation analysis of five candidate genes in Chinese patients with hypospadias[J]. Eur J Hum Genet, 2004, 12: 706–712.
- 6 Thai HT, Kalbasi M, Lagerstedt K, et al. The valine allele of the V89L polymorphism in the 5-alpha-reductase gene confers a reduced risk for hypospadias[J]. J of Endocrinol and Metab, 2005, 90: 6695–6698.
- 7 Aschim EL, Nordenskjöld A, Giwercman A, et al. Linkage between cryptorchidism, hypospadias, and GGN repeat length in the androgen receptor gene[J]. J ClinEndocrinol-Metab, 2004, 89: 5105–5109.
- 8 Radpour R, Rezaee M, Tavasoly A, et al. Association of long polyglycine traces (GGN repeats) in exon 1 of the androgen receptor gene with cryptorchidism and penile hypospadias in Iranian patients[J]. J Androl, 2007, 28: 164–169.
- 9 Edwards A, Hammond HA, Jin L, et al. Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups[J]. Genomics, 1992, 12: 241–253.
- 10 Dehm SM, Tindall DJ. Alternatively spliced androgen receptor variants[J]. EndocrRelat Cancer, 2011, 18: R183–R196.
- 11 Nenonen H, Björk C, Skjaerpe PA, et al. CAG repeat number is not inversely associated with androgen receptor activity in vitro[J]. Mol Hum Repro, 2010, 16(3): 153–157.
- 12 Crabbe P, Bogaert V, De Bacquer, et al. Part of the inter-individual variation in serum testosterone levels in healthy men reflects differences in androgen sensitivity and feedback set point: contribution of the androgen receptor polyglutamine tract polymorphism [J]. J ClinEndocrinol-Metab, 2007, 92: 3604–3610.
- 13 Sun JH, Lee SA. Association between CAG repeat polymorphisms and the risk of prostate cancer: a meta-analysis by race, study design and the number of (CAG) n repeats polymorphisms[J]. Int J Mol Med, 2013, 32: 1195–1203.
- 14 Xia Y, Che Y, Zhang X, et al. Polymorphic CAG repeat in the androgen receptor gene in polycystic ovary syndrome patients[J]. Mol Med Rep, 2012, 5(5): 1330–1334.
- 15 Davis-Dao C, Koh CJ, Hardy BE, et al. Shorter androgen receptor CAG repeat lengths associated with cryptorchidism risk among Hispanic white boys [J]. J ClinEndocrinol-Metab, 2012, 97(3): E393–E399.
- 16 Adamovic, Nordenskjöld. The CAG repeat polymorphism in the Androgen receptor gene modifies the risk for hypospadias in Caucasians[J]. BMC Med Genetics, 2012, 13: 109–112.
- 17 Chang CS, Kokontis J, Liao ST, et al. Structural analysis of complementary DNA and amino acid sequences of human and rat androgen receptors [J]. Proc Natl Acad Sci, 1988, 85: 7211–7215.

讣告

我妻沈恩濂女士,因老年性肺炎,医治无效,于2014年7月12日星期六晚9时25分逝世。享年92岁。遗体在家人子女护送下,已于7月18日在昌平火化。因天气炎热,仪式从简。各方奠仪,一概璧谢。事先未敢惊动亲朋好友。谨此奉告,敬祈见谅。

老爱人张金哲敬告
2014年7月18日