

PLCB1 基因多态性与中国汉族女童中枢性性早熟的关联性

李頔^{1,2}, 罗青山², 谌丁艳², 吴宇², 黄园园², 李莹莹², 苏喆³, 周丽²

1. 华中科技大学同济医学院公共卫生学院, 湖北 武汉 430030; 2. 深圳市疾病预防控制中心; 3. 深圳市儿童医院

【摘要】 目的 探讨 *KISS1/GPR54* 信号通路下游关键基因 *PLCB1* 上 SNP 位点多态性与中国汉族女童中枢性性早熟发病风险之间的关联, 为中枢性性早熟的早期筛查和风险预警提供生物标志物。**方法** 于 2016 年 9 月至 2018 年 5 月招募经医院首次确诊的中枢性性早熟女童及年龄与其相匹配 (± 3 个月) 的正常对照共 169 对, 检测 *PLCB1* 基因上功能性 SNP 位点 *rs6140544*、*rs11476922*、*rs3761170*、*rs2235613* 的基因型, 并探讨突变与疾病发病风险的关联性。**结果** 校正母亲初潮年龄、母亲生育年龄、体质指数 (BMI)、就寝时间后, 在隐性模型中, *rs2235613* 位点突变与疾病发病风险呈负相关 ($OR=0.46, 95\%CI=0.24\sim0.91$); 在显性模型中, *rs3761170* 位点突变与疾病发病风险呈正相关 ($OR=1.99, 95\%CI=1.01\sim3.93$)。**结论** *rs3761170* 位点突变可增加汉族女童中枢性性早熟的发病风险; 而 *rs2235613* 位点突变对疾病的发生具有保护作用。

【关键词】 基因; 青春期, 早熟; 生长和发育; 回归分析; 儿童; 女 (雌) 性

【中图分类号】 R 173 R 725.8 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-9817(2020)07-1040-04

Association of *PLCB1* gene polymorphism with the risk of central precocious puberty in Chinese Han girls/Li Di*, LUO Qingshan, CHEN Dingyan, WU Yu, HUANG Yuanyuan, LI Yingying, SU Zhe, ZHOU Li. * School of Public Health, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan (430030), China

【Abstract】 Objective To investigate the association between mutation of *PLCB1*, the downstream gene of *KISS1/GPR54* pathway, and the risk of central precocious puberty (CPP) in Chinese Han girls. **Methods** Totally 169 pairs of CPP girls on their first visit to hospital and age-matched controls (± 3 months) were recruited. The genotypes of *rs6140544*, *rs11476922*, *rs3761170* and *rs2235613* were determined and the effect of loci variations on CPP was investigated. **Results** After adjusting for confounding factors (BMI, maternal age at menarche, maternal age at birth, and time for bed), *rs2235613* variation was significantly negative associated with CPP in recessive models ($OR=0.46, 95\%CI=0.24\sim0.91$), and mutation in *rs3761170* increased the risk of CPP in dominant models ($OR=1.99, 95\%CI=1.01\sim3.93$). **Conclusion** The study suggests that mutation in *rs3761170* increases the risk of CPP and *rs2235613* variation may have a protective effect on the risk of CPP.

【Key words】 Genes; Puberty, precocious; Growth and development; Reression analysis; Child; Female

近年来, 在世界范围内出现儿童性早熟发病率逐年上升的趋势, 其中女童更甚, 男童与女童的性早熟发病率比例约为 1:(15~20)^[1]。女童性早熟主要表现为第二性征提前出现, 包括乳房发育、阴毛发育、月经初潮年龄提前等。近 30 年的调查显示, 我国女童青春发动时相不断提前^[2]。性早熟不仅会导致骨垢线提前闭合进而影响儿童成年身高^[3], 还有众多健康危害, 包括肥胖、2 型糖尿病^[4]、乳腺肿瘤^[5]以及心理健康问题^[6]等。因此, 女童性早熟不仅发病率逐年升高, 还严重危害儿童青少年及其成年后的身心健康,

关于女童性早熟发病机制及早期风险预警的相关研究十分重要。

中枢性性早熟 (central precocious puberty, CPP) 是性早熟最为常见的一种, 为下丘脑—垂体—性腺轴 (hypothalamic pituitary gonadal axis, HPG) 提前激活所致, HPG 轴激活主要依赖于神经细胞内促性腺激素释放激素 (GnRH) 的分泌^[7]。*KISS1/GPR54* 信号通路是目前已知的 GnRH 分泌最重要的通路之一, 以往研究多关注于 *KISS1*、*GPR54* 2 个基因多态性的改变与 CPP 发病风险的关联。实际上, *KISS1*、*GPR54* 的信号需要通过下游关键基因 *PLCB1* 介导才能传递至神经细胞内进而发挥作用^[8]。因此, 探讨 *PLCB1* 基因上功能性 SNP 位点多态性与中枢性性早熟的关联性, 为疾病的早期筛查和风险预警提供流行病学依据是十分必要的。

1 对象与方法

1.1 对象 病例组为 2016 年 9 月至 2018 年 5 月首

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目 (81673201); 深圳市卫计委临床研究项目 (SZLY2018014); 深圳市三名工程项目 (SZSM201511007); 中国博士后科学基金项目 (2019M663112)。

【作者简介】 李頔 (1989-), 女, 江西上饶人, 博士, 公卫医师, 主要研究方向为儿童青少年健康。

【通讯作者】 周丽, E-mail: alliedc@163.com。

DOI: 10.16835/j.cnki.1000-9817.2020.07.023

次就诊于深圳市儿童医院内分泌科并经儿科内分泌专家诊断为 CPP 的中国汉族女童。CPP 的诊断标准为 8 岁以前出现乳房发育 Tanner 2 级以上,合并至少 1 项以下症状:阴毛发育、骨龄大于实际年龄 2 个标准差、生长速度加快;且以激素激发试验明确诊断,激素激发试验中,黄体生成素(LH)峰值>5.0 IU/L, LH 与卵泡刺激素(FSH)比值>0.66^[9]。排除标准:(1)卵巢肿瘤、下丘脑错构瘤等器质性病变引起的性早熟;(2)患有慢性肾病、癫痫和哮喘等慢性疾病的患者;(3)之前经过治疗再次入院的患者。对照组为病例组所在小学,或邻近 5 km 以内小学的学生,按照年龄(±3 个月)、性别、民族 1:1 匹配。纳入标准:经专业儿童保健医师体检确定无性发育的正常女童。排除标准:患有任一内分泌系统疾病及上述慢性疾病者。共招募 338 例研究对象,病例和对照各 169 例。本研究征得家长同意并签订知情同意后开展,已通过深圳市疾病预防控制中心伦理委员会批准(2016002 号)。

1.2 资料收集和样本采集 由经统一培训的调查员面对面问卷访谈的形式采集两组人群的社会人口统计学信息,包括儿童和家庭基本情况:年龄、就寝时间、睡眠时长、母亲初潮年龄、母亲生育年龄等。体格测量由资深体检医师进行,收集的体格测量资料包括身高、体重等。收集研究对象的 EDTA 抗凝空腹静脉血样本 3 mL,离心分离血浆和余血,分装后置于-80℃超低温冰箱保存。

1.3 DNA 提取及 SNP 位点分型检测 使用 TIAN-GEN 血液基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司)提取血液 DNA。在 NCBI-SNP ([http://www.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/)

[ncbi.nlm.nih.gov/snp/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/)) 上查找功能性位点,并按照在中国汉族人群次小等位基因频率(minor allele frequency,MAF)>0.05 的标准筛选位点。运用 MassArray 质谱法对所选择的 *PLCB1* 基因上 SNP 位点 *rs6140544*、*rs11476922*、*rs3761170*、*rs2235613* 进行分型检测。

1.4 统计分析 问卷信息采用 EpiData 3.1 双录入并进行一致性检验,SPSS 21.0 进行统计分析。基线人口统计学和人体测量学资料进行 Kolmogorov-Smirnov 正态性分析,符合正态分布的用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)进行描述,不符合正态分布的用 $M(P_{25}, P_{75})$ 进行描述,分类变量以频数(百分比)表示。采用 Student's *t* 检验或 χ^2 检验比较病例对照基线资料之间的差异。两组间等位基因的比较采用 χ^2 检验;哈迪-温伯格平衡采用拟合优度 χ^2 检验进行分析;位点基因型比较采用多因素校正后加性模型(突变型 vs 杂合子 vs 野生型)、显性模型(杂合子+突变型 vs 野生型)、隐性模型(突变型 vs 杂合子+野生型)的条件 Logistic 回归分析。利用 SHEsisPlus 在线分析软件分析位点连锁不平衡及组成单体型分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 SNP 位点基本情况 如表 1 所示,*rs6140544*、*rs11476922*、*rs3761170*、*rs2235613* 的位点检出率均在 90%以上,哈迪-温伯格检验的 *P* 值大于 0.05,表明所有位点均满足遗传平衡。连锁不平衡分析显示,*rs6140544* 与 *rs11476922*、*rs3761170* 的连锁不平衡系数分别为 0.96,0.99,*rs3761170* 与 *rs2235613* 的连锁不平衡系数为 1,存在高度连锁不平衡。

表 1 *PLCB1* 基因上 SNP 位点基本情况

SNP 位点	检出率/%	哈迪-温伯格 平衡检验 <i>P</i> 值	染色体情况	定位*	区域	中国北京汉族 人群次小等位 基因频率	主、次等 位基因
<i>rs6140544</i>	98	0.99	20p12	8131311	启动子	0.121	C,G
<i>rs11476922</i>	99	0.78	20p12	8131941	启动子	0.442	C,DEL
<i>rs3761170</i>	100	0.92	20p12	8737066	同义区	0.058	G,A
<i>rs2235613</i>	98	0.74	20p12	8774596	同义区	0.461	T,C

注: * 基于 NCBI 发布的 GRCh38.p12 版本基因组信息,DEL 为缺失型突变。

2.2 研究对象基本情况 病例与对照组的年龄分别为(8.35±0.65)(8.41±0.74)岁,两组研究对象的身高、体重、体质量指数(body mass index,BMI)、母亲初潮年龄、母亲生育年龄、就寝时间分布差异均有统计学意

义(*P* 值均<0.05)。对照组与病例组就寝时间在 21:00 之前、21:00—22:00 和 22:00 之后的分别为 6 和 0,137 和 123,26 和 46 人,差异有统计学意义($\chi^2=12.31,P<0.01$)。见表 2。

表 2 女童性早熟病例与对照组基本情况比较($\bar{x}\pm s$)

组别	人数	年龄/岁	身高/cm	体重/kg	BMI/(kg·m ⁻²)	母亲初潮 年龄/岁	母亲生育 年龄/岁	睡眠时长/ (h·d ⁻¹)
对照组	169	8.41±0.74	130.54±7.96	26.92±6.54	15.71±2.87	14.06±1.45	25.89±3.62	8.70±0.64
病例组	169	8.35±0.65	134.92±6.55	30.91±6.22	16.89±2.64	13.00±1.42	27.65±3.80	8.59±0.69
<i>t</i> 值		0.84	-5.53	-5.75	-3.93	6.79	-4.34	1.48
<i>P</i> 值		0.40	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.14

2.3 *PLCB1* 基因多态性与 CPP 发病风险的关联 结果发现,4 个位点的等位基因在两组间分布差异无统计学意义(见表 3)。进一步用加性模型、隐性模型和显性模型对基因型进行分析。在加性模型中,校正了母亲初潮年龄、母亲生育年龄、BMI、就寝时间后,未发

现 4 个位点突变与 CPP 发病风险有关联($P>0.05$);在隐性模型中,校正上述危险因素后,*rs2235613* 与 CPP 发病风险呈负相关($OR=0.46,95\%CI=0.24\sim0.91$);在显性模型中,*rs3761170* 位点突变与 CPP 发病风险呈正相关($OR=1.99,95\%CI=1.01\sim3.93$)。见表 4。

表 3 性早熟病例组与对照组女童 SNP 位点等位基因分布比较

组别	位点数	<i>rs6140544</i>		<i>rs11476922</i>		<i>rs3761170</i>		<i>rs2235613</i>	
		C	G	DEL	A	G	A	C	T
对照组	338	272 (82.93)	56 (17.07)	188 (56.63)	144 (43.37)	303 (90.72)	31 (9.28)	161 (49.09)	167 (50.91)
病例组	338	271 (81.63)	61 (18.37)	180 (53.57)	156 (46.43)	298 (88.17)	40 (11.83)	167 (50.30)	165 (49.70)
OR 值		1.09		1.13		1.31		0.95	
95%CI		0.73~1.63		0.83~1.54		0.80~2.15		0.70~1.29	
P 值		0.66		0.43		0.28		0.76	

注:() 内数字为构成比/%;DEL 为缺失型突变。

表 4 SNP 位点突变与中国汉族女童 CPP 发病风险关联

SNP 位点	人数		加性模型		隐性模型		显性模型	
	对照组	病例组	OR 值(OR 值 95%CI)	P 值	OR 值(OR 值 95%CI)	P 值	OR 值(OR 值 95%CI)	P 值
<i>rs6140544</i>								
CC	113	111	1.30(0.78~2.18)	0.32	0.79(0.18~3.41)	0.75	1.46(0.81~2.60)	0.21
CG	46	49						
GG	5	6						
<i>rs11476922</i>								
DEL.DEL	51	49	1.53(0.99~2.38)	0.06	1.87(0.94~3.69)	0.07	1.52(0.76~3.03)	0.24
DEL.A	86	82						
AA	29	37						
<i>rs3761170</i>								
GG	137	130	1.85(0.97~3.53)	0.06	0.48(0.01~22.64)	0.71	1.99(1.01~3.93)	0.05
AG	29	38						
AA	1	1						
<i>rs2235613</i>								
CC	42	37	0.72(0.47~1.09)	0.12	0.46(0.24~0.91)	0.02	0.95(0.51~1.77)	0.87
TC	77	93						
TT	45	36						

注:加性模型为以野生型基因型为参考,每增加 1 个突变等位基因的发病风险;隐性模型为以野生型+杂合子基因型为参考,突变纯合子的发病风险;显性模型为以野生型基因型为参考,杂合子+突变纯合子的发病风险。

2.4 单体型分析 同一染色体上 2 个以上多态性位点通常会组成不同的单体型,因此进一步分析 4 个位点组成单体型情况。*rs6140544*、*rs11476922*、*rs3761170*、*rs2235613* 能够组成 7 个频率>0.03 的单体型,但在两组间分布差异均无统计学意义。见表 5。

表 5 *rs6140544*、*rs11476922*、*rs3761170* 与 *rs2235613* 多态性位点组成的单体型分析

位点单体型	人数		OR 值(OR 值 95%CI)	P 值
	对照组	病例组		
C.DEL.G.C	47	49	1.05(0.68~1.62)	0.83
C.DEL.G.T	105	103	0.97(0.70~1.35)	0.87
CAGC	49	39	0.77(0.49~1.21)	0.25
C.DEL.A.C	25	26	1.04(0.59~1.85)	0.88
GAGT	23	22	0.95(0.52~1.75)	0.88
GAGC	31	39	1.29(0.79~2.12)	0.31
GAGT	35	39	1.13(0.70~1.83)	0.62

注:已剔除频率<0.03 的单体型。

3 讨论

本研究结果发现,*rs3761170* 位点突变能够增加 CPP 的发病风险;*rs2235613* 位点突变对疾病的发生具

有保护作用。

KISS1/GPR54 通路是青春期调节 GnRH 分泌的重要通路,而以往关于 *KISS1/GPR54* 通路与性早熟的研究只着重于 *KISS1*、*GPR54* 两基因多态性,如 Luan 等对 *KISS1* 和 *GPR54* 基因进行了测序,发现 *KISS1* 基因上 *rs192636495* 位点、*GPR54* 上一新位点与中国汉族女童 CPP 发病风险相关^[10-11]。实际上,*KISS1/GPR54* 信号传入神经细胞内将激活 *PLCB1* 基因编码的 *PLCB1* 蛋白,后者将磷脂酰肌醇水解为第二信使 DAG、IP3 才能发挥信号传递、促进 GnRH 以及 LH 分泌的功能^[12]。有研究表明,下调 *PLCB1* 会损害 GnRH 生成、下调 LH 分泌^[13],因此,*PLCB1* 是 GnRH 分泌的关键环节。

PLCB1 基因位于 20 号染色体短臂,本研究所选位点 *rs6140544*、*rs11476922* 在基因启动子区,*rs3761170*、*rs2235613* 位于同义突变区。等位基因分布情况显示所选位点在两组间差异无统计学意义,进一步的遗传模型分析发现,在隐性模型中,*rs2235613*

位点突变与 CPP 发病风险呈负相关,而在显性模型中 *rs3761170* 与疾病呈正相关。遗传模型是从不同角度探讨 SNP 位点突变与疾病的关联^[14],本研究的结果表明,*rs2235613* 位点突变纯合子对女童性早熟发病具有保护作用,而 *rs3761176* 位点中携带突变等位基因者可能有更高的性早熟风险。Bakhsh 等^[15]对具有多结节甲状腺肿遗传史的家族进行全基因组分析和二代测序发现,患病者 *PLCB1* 基因内含子中存在缺失性突变,并进一步在队列人群中进行验证,发现这一缺失性突变与多结节甲状腺肿发病相关。另外一项对卵巢发育不全病人的研究表明,*PLCB1* 基因功能损害会影响生育能力^[16]。以上研究均证实了 *PLCB1* 基因在调节身体内分泌过程中的重要作用。

本研究探讨了 *PLCB1* 基因上位点 *rs6140544*、*rs11476922*、*rs3761170*、*rs2235613* 多态性与中国汉族女童 CPP 的关联,为疾病的早期筛查和风险预警提供了临床依据。但本研究仍存在不足:首先,本研究只招募了 169 对病例对照,样本量较小;其次,本研究所选 SNP 位点数较少,不能完全反映基因与疾病的联系;最后,本研究所有的研究对象均为女童,结果无法外推至男童性早熟。因此,关于 *PLCB1* 基因与性早熟发病风险的关联性还需进一步多位点或二代测序的大样本研究验证。

4 参考文献

- [1] LATRONICO A C, BRITO V N, CAREL J C. Causes, diagnosis, and treatment of central precocious puberty[J]. Lancet, 2016,4(3): 265-274.
- [2] 中国学生体质与健康调研组. 2010 中国学生体质与健康调研报告[M].北京:高等教育出版社,2010.
- [3] CAREL J C, LÉGER J. Clinical practice. Precocious puberty[J]. New Engl J Med, 2008,358(22):2366-2377.
- [4] PRENTICE P, VINER R M. Pubertal timing and adult obesity and cardiometabolic risk in women and men: a systematic review and meta-analysis[J]. Int J Obes, 2005,37(8):1036-1043.
- [5] RITTE R, LUKANOVA A, TJNNELAND A, et al. Height, age at menarche and risk of hormone receptor-positive and negative breast cancer: a cohort study[J]. Int J Cancer, 2013,132(11):2619-2629.
- [6] XHROUET-HEINRICHS D, LAGROU K, HEINRICHS C, et al. Longitudinal study of behavioral and affective patterns in girls with central precocious puberty during long-acting triptorelin therapy[J]. Acta Paediatr, 1997,86(8):808-815.
- [7] AGUIRRE R S, EUGSTER E A. Central precocious puberty: from genetics to treatment[J]. Best Pract Res Clinl Endocr Metabol, 2018, 32(4):343-354.
- [8] TREVISAN C M, MONTAGNA E, DE OLIVEIRA R, et al. Kisspeptin/GPR54 system: what do we know about its role in human reproduction? [J]. Cell Physiol Biochem, 2018,49(4):1259-1276.
- [9] LEE H S, YOON J S, ROH J K, et al. Changes in body mass index during gonadotropin-releasing hormone agonist treatment for central precocious puberty and early puberty[J]. Endocrine, 2016,54(2): 497-503.
- [10] LUAN X, ZHOU Y, WANG W, et al. Association study of the polymorphisms in the KISS1 gene with central precocious puberty in Chinese girls[J]. Eur J Endocrinol, 2007,157(1):113-118.
- [11] LUAN X, YU H, WEI X, et al. GPR54 polymorphisms in Chinese girls with central precocious puberty[J]. Neuroendocrinol, 2007,86(2):77-83.
- [12] RHEE S G. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C [J]. Ann Rev Biochem, 2001,70(1):281-312.
- [13] LIU F, RUIZ M S, AUSTIN D A, et al. Constitutively active Gq impairs gonadotropin-releasing hormone-induced intracellular signaling and luteinizing hormone secretion in LbetaT2 cells[J]. Molecul Endocrinol, 2005,19(8):2074-2085.
- [14] LEWIS C M. Genetic association studies: design, analysis and interpretation[J]. Br Bioinf, 2002,3(2):146-153.
- [15] BAKHSH A D, LADAS I, HAMSHERE M L, et al. An inDel in phospholipase-C-B-1 is linked with euthyroid multinodular goiter [J]. Offic J Am Thyroid Assoc, 2018,28(7):891-901.
- [16] LEDIG S, RPKE A, WIEACKER P. Copy number variants in premature ovarian failure and ovarian dysgenesis[J]. Sex Dev, 2010,4(4/5):225-232.
- [15] LAMBERT J D, GREAVES C J, FARRAND P, et al. Web-based intervention using behavioral activation and physical activity for adults with depression (the emotion study): pilot randomized controlled trial [J]. J Med Int Res, 2018,20(7):e10112.
- [16] RHO M J, LEE H, LEE T H, et al. Risk factors for internet gaming disorder: psychological factors and internet gaming characteristics[J]. Int J Environ Res Public Health, 2018,15(1):40-50.
- [17] 丁云,黄玲玲,冯陈哲,等. 参与住院医师规范化培训的医师抑郁现状与自我效能感的关系[J]. 中南大学学报:医学版, 2017, 42(1):83-87.
- [18] FUHR K, HAUTZINGER M, KRISCH K, et al. Validation of the Behavioral Activation for Depression Scale (BADS)-Psychometric properties of the long and short form[J]. Compr Psychiatry, 2016,66(1): 209-218.
- [19] EPKINS, CATHERINE C. Experiential avoidance and anxiety sensitivity: independent and specific associations with children's depression, anxiety, and social anxiety symptoms[J]. J Psychopathol Behav, 2016,38(1):124-135.
- [20] JENSEN M P, EHDE D M, DAY M A. The behavioral activation and inhibition systems: implications for understanding and treating chronic Pain[J]. J Pain, 2016,17(5):529.
- [21] SAMAN Z, DENNIS B B, KALBFLEISCH L, et al. Behavioral activation group therapy for reducing depressive symptoms and improving quality of life: a feasibility study[J]. Pilot Feasib Stud, 2016,2(1): 1-11.

收稿日期:2020-02-21;修回日期:2020-03-21

(上接第 1039 页)

收稿日期:2020-02-12;修回日期:2020-03-25