

DOI: 10.13376/j.cblls/2017006

文章编号: 1004-0374(2017)01-0043-09



陈子江, 山东大学妇产科学教授、博士生导师、“973”项目首席科学家、国家百千万人才、全国优秀博士学位论文指导教师。专业领域为妇科内分泌、生殖医学与生殖遗传学。现任山东大学副校长、齐鲁医学部主任、山东省立医院妇产科主任。兼任国家辅助生殖与优生工程技术研究中心主任、生殖内分泌教育部重点实验室(山东大学)主任、上海市辅助生殖与优生重点实验室主任。担任中华医学会妇产科分会妇科内分泌学组组长、中国医师协会临床研究学组组长、国际生殖学会联盟(IFFS)常务理事兼副秘书长、亚太地区生殖医学会(ASPIRE)常务理事等职务, *Human Reproduction Update* 副主编、《中华妇产科杂志》副总编辑以及多个国内外学术杂志编委。

## 重大生殖疾病的分子机制研究

赵世刚, 陈子江\*

(山东大学附属省立医院, 山东大学附属生殖医院, 国家辅助生殖与优生工程技术研究中心, 生殖内分泌教育部重点实验室, 济南 250001)

**摘要:** 重大生殖疾病是一组严重影响生殖健康, 病因和临床表现高度异质的疾病群, 其中女性常见的有多囊卵巢综合征(PCOS)、卵巢早衰(POF)等, 遗传因素在疾病的发生发展中起到重要作用。近年来, 依靠高通量技术, 如全基因组关联分析、全外显子组测序等, 我国在重大生殖疾病的遗传学研究中取得了重要进展, 主要包括对PCOS和POF大样本散发病例及其对照进行全基因组关联研究、家系患者的全外显子组或全基因组测序研究等, 鉴定出多个遗传易感位点, 获得大量候选基因的信息。虽然这些研究结果为解析疾病提供了大量线索, 但是也提出了更多挑战。如何深入研究这些易感位点在疾病中的致病机制, 及其在复杂疾病诊治中的转化应用成为日后的工作重点, 现就相关分子机制研究进展做一简要论述。

**关键词:** 多囊卵巢综合征; 卵巢早衰; 全基因组关联研究; 机制

中图分类号: R714 文献标志码: A

## Molecular mechanisms of major reproductive diseases

ZHAO Shi-Gang, CHEN Zi-Jiang\*

(Center for Reproductive Medicine, Shandong Provincial Hospital Affiliated to Shandong University; Shandong Provincial Key Laboratory of Reproductive Medicine; National Research Center for Assisted Reproductive Technology and Reproductive Genetics, China; The Key Laboratory for Reproductive Endocrinology of Ministry of Education, Jinan 250001, China)

**Abstract:** The major reproductive diseases are a group of disorders, which seriously affect reproductive health and have a high clinical and genetic heterogeneity. Polycystic ovary syndrome (PCOS) and premature ovarian failure (POF) characterized by menstrual and ovulation disorders and infertility, are the most common reproductive diseases for women. Genetic factors play an important role in the development of these diseases. In recent years,

收稿日期: 2016-07-18

基金项目: 卫生公益性行业科研专项(201402004)

\*通信作者: E-mail: chen zijiang@vip.163.com

Chinese researchers have made significant achievements in the genetic etiology study of the reproductive diseases based on high-throughput technologies, such as genome-wide association study (GWAS) and the whole exome sequencing (WES). Through the first GWAS in sporadic PCOS and POF patients and the WES in POF pedigrees, we identified a lot of genetic susceptibility loci for both of the two diseases. Although these loci provide clues for etiology study, how to illustrate the pathogenesis of them and make translational application in disease diagnosis and treatment will be the next challenge. Here we make a brief description of the research progress on molecular mechanisms of the major reproductive diseases.

**Key words:** polycystic ovary syndrome; premature ovarian failure; genome-wide association study; mechanism

现代社会环境污染加重、饮食结构改变、工作压力增大等因素严重影响女性生殖健康,由此引起的卵巢功能异常和不孕症等一系列重大生殖疾病已成为全球性的公共卫生问题。据世界卫生组织预测,不孕症将成为仅次于肿瘤和心脑血管疾病的第三大疾病。2015年我国不孕不育大数据调查报告显示,不孕不育的发病率已高达15%,且呈现出不断升高与年轻化的趋势,其中女方因素占40%。因此,我国女性生殖健康正面临着巨大挑战。

提高生殖健康水平,改善出生人口素质是21世纪人类生殖医学发展的重要使命。进入21世纪以来,生殖医学基础研究取得了一系列举世瞩目的成就,如动物克隆、干细胞等,为生殖医学的发展带来契机。然而,这些成果大多尚未直接造福于人类,主要原因是对生殖与发育过程及其机理缺乏系统深入的研究。为满足我国重大战略需求,解决我国人口增长量大、出生缺陷多、生殖疾病发病率持续上升等问题,《国家中长期科学和技术发展规划纲要(2006—2020年)》提出设立“发育与生殖”重大研究计划,把生殖细胞发生、成熟与受精,人体生殖功能衰退的机制作为重点研究领域,以实现生殖与发育科学理论的突破和技术创新,为生殖疾病的预防和诊治服务<sup>[1-2]</sup>。

生殖疾病是涉及男性/女性生殖系统的一组疾病,往往表现为不孕(育)症。其中女性常见的重大生殖障碍性疾病主要有多囊卵巢综合征和卵巢早衰。该类疾病具有一些共同特点,如病因复杂、疾病的分子发生机制不明、遗传和环境因素联合作用、临床治疗缺乏个体化和有效的靶向性等。同时,每种疾病又各有特点,患者个体差异较大、异质性强。为详细阐明其分子机制,我们分述如下。

## 1 多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)

多囊卵巢综合征是一种临床表现复杂,以稀发/

无排卵、高雄激素和卵巢多囊样改变为主要特征的内分泌及生殖功能障碍性疾病。其典型临床表现包括不孕、月经稀发或闭经、多毛、痤疮、肥胖等。由于PCOS的临床表型具有高度异质性,PCOS的诊断标准并不统一,关于其发病率的报道也各异。随着对该疾病认识的深入,PCOS的诊断标准也逐步得到完善。2011年,由山东大学附属省立医院牵头,联合全国多家生殖中心,基于大样本数据分析,制定了PCOS行业诊断标准<sup>[3]</sup>,推动了我国PCOS规范化诊疗的进程。由于新标准实施时间较短,加之我国地域广阔、民族众多,有着庞大的PCOS患者人群,所以现阶段尚缺乏基于新标准的大规模流行病学调查资料。先前研究显示,我国PCOS的患病率高达5.61%<sup>[4]</sup>,国家卫生和计划生育委员会的官方数据显示,2012年我国已婚育龄妇女近2.5亿,据此推算PCOS已累及超过1400万中国女性。PCOS不仅影响女性的生殖功能,而且越来越多的循证医学研究表明,PCOS与一系列影响健康的重大疾病密切相关。研究表明,育龄期PCOS患者中肥胖发生率高达40%~50%,代谢综合征高达24.9%,而且PCOS患者常伴发焦虑、抑郁等精神症状<sup>[5-6]</sup>。除PCOS伴发疾病外,与正常人群比较,PCOS患者发生胰岛素抵抗、2型糖尿病、高血压及心脑血管疾病等远期并发症的风险显著增加,且这种高风险会持续到绝经后<sup>[7-8]</sup>。因此,PCOS已超越了妇产科领域,成为一种累及全身,威胁女性身心健康的终生性内分泌代谢疾病<sup>[9]</sup>。

目前,多囊卵巢综合征的病因尚未完全明确。多数研究认为,遗传和环境因素联合作用是导致该疾病的主要原因<sup>[10-11]</sup>。因此,从遗传和环境的角度寻找PCOS的致病病因,解析其分子发生机制一直是该领域的研究热点。PCOS具有明显的家族聚集现象,家系研究发现,PCOS的主要临床特点如月经稀发、多毛、高雄激素血症等,在患者一级亲属中的发生率显著高于一般人群,PCOS发生率也明

显增加, 其母亲与姐妹的 PCOS 患病率分别是 24% 和 32%, 远高于一般人群<sup>[12-14]</sup>。一项针对荷兰 3 100 余对双胞胎的调查发现<sup>[15]</sup>, 单卵双胞胎中, PCOS 的相关系数高达 0.72, 双卵双胞胎中为 0.38, 提示遗传因素在该疾病发生中起到关键作用。通过对 PCOS 家系的遗传情况分析发现, 女性家族成员多以 PCOS、男性家族成员多以早秃为表型, 表现出常染色体显性遗传的特征。但是目前流行病学研究认为 PCOS 的遗传模式可能比常染色体为主的遗传模式更复杂, 并不符合典型的孟德尔遗传规律, 该疾病可能是性染色体或多基因遗传模式。因而, 越来越多的研究者从家系研究, 逐步过渡到候选基因关联研究, 以期寻找到疾病的关键致病基因。PCOS 候选基因研究通常是在 PCOS 现有病理生理特点, 如胰岛素抵抗、高雄激素等基础上, 选择生物学上可能相关的基因进行关联性分析。已报道的候选基因常涉及雄激素合成和作用的基因 (*CYP11A*、*CYP17A*、*CYP21* 等)、胰岛素抵抗相关基因 (*INS*、*INSR*、*IRS-1* 等)、炎症细胞因子相关基因 (*TNF*、*TNFR*、*IL6* 等)。迄今为止, 已经发现 100 余个 PCOS 候选基因, 但由于选择的主观性、样本量、统计效能等问题, 鲜有基因得到广泛验证<sup>[16]</sup>。

近年来, 随着人类基因组计划的完成、人类基因组单倍体图谱计划的实施及高通量基因分型技术的成熟, 全基因组关联研究 (genome-wide association study, GWAS) 为发现和鉴定影响人类性状形成和复杂性疾病产生的遗传变异提供了重要的线索。GWAS 是应用人类全基因组范围内的数以百万计的 SNPs 为标记, 在大样本量的研究对象中筛选与疾病或者性状相关的位点, 然后在独立人群中进行验证, 最终确定关键性 SNP 位点。与以往的候选基因关联分析策略明显不同的是: 首先, GWAS 不需要根据那些尚未充分阐明的病理生理机制来假设某些特定的基因或位点与疾病相关联; 其次, GWAS 建立在大样本量、严格的质控与检验以及独立的人群验证的基础上, 能够有效控制假阳性结果的发生概率, 确保研究结果的全面性与可靠性。可以说, GWAS 对发现复杂疾病的微效基因具有很大优势, 更适宜于研究复杂疾病背后的致病基因或位点<sup>[17]</sup>。2011 年, GWAS 首次在 PCOS 领域得以应用, 发现了三个与 PCOS 显著相关的易感区域 2p16.3 (*THADA*)、2p21 (*LHCGR*) 和 9q33.3 (*DENND1A*)<sup>[18]</sup>; 随后扩大样本量 (包含了 10 480 例 PCOS 患者和 10 489 例对照) 开展的第二期 GWAS 研究又发现 8 个新的

易感区域 9q22.32 (*C9orf3*)、11q22.1 (*YAP1*)、12q13.2 (*RAB5B* 和 *SUOX* 间)、12q14.3 (*HMG2*)、16q12.1 (*TOX3*)、19p13.3 (*INSR*)、20q13.2 (*SUMO1P1*) 和 2p16.3 (*FSHR*)<sup>[19]</sup>。其中多个位点与生殖内分泌 (*FSHR*、*LHCGR*)、生长发育 (*YAP1*)、能量代谢 (*INSR*、*THADA*) 等密切相关, 这些发现为解析临床表现高度异质的 PCOS 的发病机制提供了新思路。

纵观 GWAS 研究发现的 11 个易感区域对应的候选基因, 有许多是在 PCOS 研究领域从未受到关注的, 比如 *DENND1A*、*THADA*、*C9orf3* 等。全面解析这些新发现的易感基因在 PCOS 疾病发生发展中的作用成为后 GWAS 时代的研究重点。以在不同人群 (丹麦、澳大利亚、冰岛、美国不同地区)<sup>[20-23]</sup> 中得到最为广泛验证的一个区域 (9q33.3) 为例, 该区域对应的基因为 *DENND1A*, 编码一种含 DENN (differentially expressed in normal and neoplastic cells) 结构域 (uDENN、cDENN 和 dDENN) 和 clathrin 结合结构域的蛋白——Connecdenn1, 可作为 Rab35 的鸟嘌呤交换因子 (GEF), 与 clathrin 及适应蛋白 2 (AP2) 结合, 介导细胞内吞, 参与调控蛋白质与脂质代谢<sup>[24-26]</sup>。*DENND1A* 有两个转录本, 分别编码含 1 009 个氨基酸 (转录本 1、22 个外显子) 和 559 个氨基酸 (转录本 2、21 个外显子) 的蛋白。两者的主要区别在于前者 C 末端有 1 个富含脯氨酸的结构域, 而后者仅有 33 个氨基酸序列。研究发现, *DENND1A* 在睾丸、卵巢膜间质以及 H295 肾上腺肿瘤细胞系等雄激素合成部位均有表达; 该基因短转录本 2 在 PCOS 患者卵巢卵泡膜细胞中表达异常升高, 过表达 *DENND1A* 可直接改变 *CYP17A1* 基因启动子活性, 促进其表达, 使雄激素合成增加, 进而介导 PCOS 患者的高雄表型<sup>[27-28]</sup>。另外, 我们对该区域的 3 个 SNP 位点 (rs10818854、rs2479106、rs10986105) 进行基因型与临床表型关联分析, 发现 rs2479106 与 OGTT 2 小时胰岛素水平存在相关性<sup>[29]</sup>, 提示该区域可能与 PCOS 患者的胰岛素抵抗状态有关, 其中的分子机制有待阐明。从基因本身的角度考虑还有许多谜团等待解答, 比如两个转录本在 PCOS 患者体内表达丰度不同的原因是什么。结合新近研究报道<sup>[30]</sup>, PCOS 患者体内雄激素受体的剪切差异直接影响 PCOS 患者雄激素合成和卵泡发育, 推测 PCOS 患者体内基因的剪切差异可能是解析疾病发生的一个关键方向。不仅如此, 我们研究发现 *DENND1A* 在不同组织内均有表达, 那么 *DENND1A* 在 PCOS 患者其他组织内是否也有转录本差异表达的现象,



其在不同组织中的作用是否具有特异性等等。可以说,对于 *DENND1A* 这样的“新易感基因”的研究仍处于起步阶段,需要各国科学家共同努力,全方位多角度开展其在 PCOS 发病中的分子机制研究。随着研究手段的飞跃发展及检测成本的不断降低,有必要利用高通量筛选寻找其调控的基因,同时针对该易感区域进行全基因组测序以寻找真正的致病性变异位点。

研究新基因的同时,传统基因的作用亦不能忽略,比如 *FSHR*、*LHCGR*、*INSR* 等。虽然这些基因的研究报道已经非常多,但是随着对基因组认识的深入,我们可以从新的角度研究这些传统基因在 PCOS 患者体内异常表达的分子机制。以 *LHCGR* 为例,*LHCGR* 由 11 个外显子组成,编码黄体生成素/人绒毛膜促性腺激素受体,属于 G 蛋白偶联受体超家族糖蛋白激素受体亚家族,主要在女性卵泡膜细胞、颗粒细胞、黄体和间质细胞中表达,参与雄激素的合成及排卵等生理过程。*LHCGR* 发生异常会直接影响 LH 的作用,引起生殖相关疾病。近两年,多国科学家针对该基因从不同层面进行研究,获得了一系列成果。在蛋白质水平上,Comim 等<sup>[31]</sup>发现 PCOS 患者卵巢组织 *LHCGR* 表达升高;在 RNA 水平,Troppmann 等<sup>[32]</sup>研究发现人颗粒细胞内 *LHCGR* 受 miR-513a-3p 直接调控;在 DNA 水平上,除以往报道的 SNP 位点关联研究外,*LHCGR* 外显子区的突变会导致 LH 水平异常升高,导致不孕不育<sup>[33]</sup>;从表观遗传学角度,*LHCGR* 的表达受到其启动子区甲基化水平的影响,本课题组前期研究发现 PCOS 患者外周血和颗粒细胞内 *LHCGR* 启动子区呈现低甲基化状态<sup>[34]</sup>,Zhu 等<sup>[35]</sup>用 DHT 构建的 PCOS 小鼠模型的卵巢中也出现了 *LHCGR* 启动子区甲基化丢失的现象。以此类推,其他候选基因在 PCOS 中的作用机制研究可以参考类似的研究思路,从 DNA 到 RNA 到蛋白质再到表观遗传,逐步揭开易感基因与疾病关系的面纱。

除了基因本身的功能研究外,针对 GWAS 发现的大量遗传变异位点 (SNP) 进行深入研究成为后 GWAS 时代的一大挑战。在当前技术体系尚不完善而且大部分 SNP 位于非编码区的情况下,SNP 的自身功能研究需要充分利用生物信息学预测,并结合体内外实验进行验证。比如 Cowper-Sallari 等<sup>[36]</sup>结合顺式作用元件组学、表观基因组学和基因型等信息,预测并通过体外实验证实乳腺癌患者易感基因 *TOX3* 内含子区的 1 个 SNP (rs4784227) 可以直接

影响先导转录因子 *FOXA1* 的结合,导致 *TOX3* 基因表达差异。Smemo 等<sup>[37]</sup>在研究肥胖关联 SNP 时发现,*FTO* 区的 SNP 位点可以远距离调控 *IRX3* 基因的表达,参与肥胖的发生发展。虽然 SNP 功能研究是一个难点,但是以上研究为我们提供了参考,相信随着技术的进步,解析 SNP 的功能将会成为一个主流。在临床上,SNP 是反应个体差异的主要分子指标之一,不同的 SNP 通常与不同的临床表型相关联。基于基因型与表型的关联分析发现,在 PCOS 患者中,rs13429458 (*THADA*) 与高 LH、高雄激素及血清 LDL 水平相关,rs4385527 (*C9orf3*) 与 PCOS 的三大临床表型(稀发/无排卵、高雄激素、PCO) 分别具有显著的独立相关性<sup>[29,38]</sup>。这些不仅为基因的功能研究指示方向,同时也为临床个性化治疗提供参考。

PCOS 的分子机制研究任重而道远。未来研究基因和 SNP 功能的同时,遵循转化医学的思路,需要收集更多具有代表性的临床样本进行基因型分析,检测易感基因在不同组织的表达丰度,结合疾病不同亚型,进行关联 SNP 位点与基因表达的相关性分析,争取建立分子分型诊断标准。在此基础上,建立 PCOS 风险预测模型,努力实现对该疾病的早期预防,尤其 PCOS 并发症的预防,同时开展药物基因组学,努力实现个体化精准治疗,减少滥用药物,解除病患痛苦,降低社会医疗负担。

## 2 卵巢早衰 (premature ovarian failure, POF)

卵巢早衰是育龄期女性常见的生殖内分泌疾病之一,患者 40 岁之前闭经,伴有绝经水平的高促性腺激素 (FSH > 40 IU/L)、雌激素缺乏等内分泌异常及生殖器官萎缩、潮热、多汗、情绪改变等围绝经期表现<sup>[39]</sup>。我国 POF 的发生率约为 1%~2%,累及约 200 万育龄期女性,而且有逐年上升的趋势。相对于西方高加索(确诊年龄 36 岁)及塞尔维亚人群(确诊年龄 34.2 岁),中国 POF 患者发病年龄更年轻化,平均确诊年龄只有 29.8 岁,发病早可能与入种差异及营养状况有关。POF 患者由于雌激素水平低,常伴发一些慢性疾病,如骨质疏松、心血管疾病等,平均寿命较正常绝经女性缩短,因此 POF 严重影响患者的生活质量<sup>[40]</sup>。

与 PCOS 的临床表现高度异质性不同,POF 常表现为病因的高度异质性。目前已报道的 POF 病因包括染色体异常、基因突变、自身免疫因素、医源性因素等,其中自身免疫性因素和医源性因素各

占 10% 左右, 遗传因素占 20%~25%, 但半数以上的患者病因仍不明确, 属特发性 POF<sup>[41-42]</sup>。不同的因素通过影响各阶段卵泡发育, 导致始基卵泡池过小、卵泡募集或功能异常、卵泡闭锁破坏加速等, 最终卵泡过早耗竭、卵巢功能衰竭。围绕卵子生成障碍和卵泡耗竭加速两种途径, 探讨遗传缺陷是特发性 POF 患者病因研究的主要方向<sup>[43]</sup>。

**染色体异常:** 有报道 POF 患者中染色体异常的发生率大约为 8.8%, 对这些染色体异常情况的分析, 一方面有助于我们探索 POF 的疾病易感区域; 另一方面也有利于为有生育希望和需求的患者提供生育指导<sup>[44]</sup>。本课题组对 POF 染色体核型分析发现<sup>[45]</sup>, 我国 POF 患者核型异常发生率为 12.1%, 其中原发性闭经患者的核型异常率 (21.4%) 显著高于继发性闭经患者 (10.6%), 提示原发性闭经患者的遗传学病因更显著。染色体异常包括常染色体异常和性染色体异常, 其中 X 染色体异常最为常见, 占有染色体异常的 93.7%。X 染色体长臂 (Xq) 是重要的卵巢功能维持区域, Xq 上的 2 个区域 Xq26-28 (POF-1) 和 Xq13.3-21.1 (POF-2) 的缺失发生率最高, 也提示位于该区域的基因可能与 POF 的发生密切相关<sup>[46]</sup>。

**基因突变:** 目前已知的 POF 致病基因主要来源于模式动物和基础生理实验研究所发现的重要卵泡发育相关基因、内分泌功能相关基因和影响卵巢功能的多效性孟德尔遗传疾病相关基因等。已报道的 POF 候选基因有数十个, 但突变导致蛋白功能损害的仅有 *FMRI*、*NR5A1*、*FST*、*BMP15*、*NOBOX*、*FIGLA* 等少数几个基因<sup>[47-51]</sup>, 大多数候选基因与 POF 的相关性仅停留在发现 DNA 序列改变阶段, 缺乏作用机制的解析。我们从 2003 年起对散发性 POF 患者进行候选基因突变筛查, 发现并验证了转录因子 *NOBOX*、*FIGLA*、*SOHLH1*、*SOHLH2*、*WT1*、*NR5A1*<sup>[52-56]</sup> 等基因突变与 POF 的相关性, 其中 *NOBOX* 和 *FIGLA* 分别被 OMIM 收录为 POF-5 和 POF-6 基因。此外, 排除了 *LHX8*、*NANOS3*、*FMRI*、*PTEN*<sup>[57-60]</sup> 等基因与中国汉族 POF 的相关性, 证实了 POF 致病基因的种族间差异。

随着高通量技术的发展, 借助全基因组关联研究 (GWAS)、拷贝数变异 (copy number variations, CNV) 和全外显子组测序 (whole exome sequencing, WES) 等组学技术寻找疾病易感位点或候选基因, 为疾病的遗传学研究提供了更高效的手段。2012 年, 大样本 POF GWAS 研究得以实施, 定位了新的易

感区域 8q22.3, 虽然是非基因区, 但该区域存在明显的组蛋白乙酰化修饰, 为研究非编码序列、表观遗传机制在 POF 发病中的作用提供了依据, 也为临床风险预测提供了新的靶点<sup>[61]</sup>。此外, 在前期 GWAS 数据的基础上, 本课题组完成了首个中国 POF 与早绝经相关位点的关联分析, 结果发现 *ESR1*、*BRSK1*、*HK3* 是 POF 的易感基因, 提示 POF 与早绝经具有相似的遗传背景, 为 POF 候选基因和发病机制研究开拓了新思路<sup>[62-63]</sup>。

目前关于 POF GWAS 的研究存在样本量偏小、研究对象分类不明确的局限性, 导致所发现的易感位点难以在独立样本或其他种族中验证。CNV 研究主要借助基于芯片的比较基因组杂交技术, 通过寻找全基因组范围内 1 kb 以上的大片段缺失或重复, 寻找与 POF 相关的拷贝数增加或减少。但是由于缺乏核心家系资源及后续功能实验, 难以确定所发现的 CNV 位点的遗传性及致病性, 而对 POF 家系进行 WES 能够充分利用相似的遗传背景 and 家系内部对照, 发现潜在的致病性基因改变。在临床工作中, 遇到的 POF 有的是卵巢功能衰竭的单一表型, 有的则是综合征性疾病的一部分, 比如 Perrault 综合征、小脸裂综合征 1 型 (BPES1)、先天性糖基化病 (CDG) 和甲状旁腺功能减退 (PHP) 等患者也表现出不同程度的卵巢功能下降。Pierce 等<sup>[64]</sup> 和 Meduri 等<sup>[65]</sup> 通过对 Perrault 综合征和 BPES1 综合征家系进行全外显子测序研究, 发现 *LARS2* 和 *FOXL2* 基因突变与 POF 密切相关。但是由于综合征性疾病的表型复杂, 容易混淆和掩盖真正的 POF 致病基因, 单一表型的 POF 家系逐渐成为 POF 遗传学研究的重点研究对象。复旦大学吴柏林教授与美国哈佛大学合作, 通过对中国汉族 POF 家系进行 WES, 发现了 *HFMI* 基因复合杂合突变与 POF 密切相关<sup>[66]</sup>。随后, 研究人员在近亲婚配的 POF 家系中陆续发现了 *STAG3*、*MCM8* 和 *MCM9* 基因突变<sup>[67-69]</sup>。同时, 本课题组在非近亲婚配的中国汉族 POF 家系中又发现了 *CSB-PGBD3*<sup>[70]</sup> 和 *MSH5* 基因突变。值得注意的是, 这些基因都是重要的 DNA 损伤修复基因, 比如 *HFMI*、*MSH5* 和 *STAG3* 参与双链 DNA 损伤的同源重组过程<sup>[71-73]</sup>, *MCM8* 和 *MCM9* 是 DNA 复制起始复合物的重要成分, 促进 DNA 双链损伤修复过程中复制叉的形成, 并募集下游修复因子<sup>[74]</sup>, *CSB-PGBD3* 基因是灵长类动物特有的 DNA 损伤修复基因, 参与单链 DNA 损伤的转录耦联修复<sup>[75]</sup>。DNA 损伤修复机制的完整



性对于卵母细胞减数分裂,尤其是第一次减数分裂前期的染色体联会和同源重组过程至关重要,也由此开启了DNA损伤修复基因功能缺陷在POF发病中的作用机制研究的热潮。

**表观遗传因素:**除了对基因外显子区域的突变研究以外,目前对非编码区域的关注越来越多。非编码区存在非编码RNA、可变剪切位点、转录因子结合序列及表观遗传修饰(DNA甲基化、染色质修饰)位点等。大量转录组研究表明,人类基因组中超过97%的转录产物是功能多样的RNA分子,包括微小RNA、转录超保守区、小核仁RNA、PIWI相互作用RNA和长链非编码RNA等。非编码RNA(ncRNA)是一类具有重要生物功能的RNA分子,参与染色质修饰、转录调控、调节RNA稳定性等生物过程,已经发现在癌症、神经系统疾病中发挥重要调控作用。本课题组发现miR-22-3p在POF患者的血浆中表达量显著降低,且与血清FSH水平负相关,提示miR-22-3p可能是反映卵巢储备功能的生物指标,可用于POF发生发展过程的预测<sup>[76]</sup>。由于外显子区域的变异仅能解释少数患者的遗传学病因,因此探讨ncRNA在POF发病中的作用及其机制是病因学研究的新方向。

**自身免疫异常:**既往研究认为免疫功能异常可能参与POF的发生,所占比例4%~30%不等<sup>[77]</sup>。POF常伴发自身免疫性疾病,如自身免疫性多内分泌腺病综合征(AIRE基因突变)、甲状腺功能低下、Addison's病、类风湿性关节炎等<sup>[39]</sup>。POF患者可以检测到多种抗卵巢自身抗体(anti-ovarian antibody, AOA),但是这些抗体在疾病中的作用机理并不清楚。有研究发现POF患者外周血T淋巴细胞和B淋巴细胞明显升高,NK细胞数目和活性降低,提示细胞免疫在POF发病中起到一定作用<sup>[78]</sup>。部分POF患者还存在自身免疫性卵巢炎,但自身免疫失调诱导卵巢衰竭的具体机制目前尚不清楚<sup>[79]</sup>。

**医源性损伤和环境因素等:**近年来,随着环境污染的加剧、生活方式的改变等,肿瘤的发生率显著升高,放化疗、盆腔手术等治疗措施导致的卵巢功能损伤时有发生,尤其是各种化疗药物,可以影响卵泡发育和成熟,加速卵泡耗竭,导致皮质纤维化和血管损伤而损害卵巢。因此,结合药物基因组学筛选副作用小的药物成为一项艰巨的任务。同时环境内分泌干扰物(重金属、有机溶剂、杀虫剂、塑化剂等)的长期暴露以及激素的滥用等都可能增加POF的发生风险<sup>[80-81]</sup>。

由上可见,POF是由遗传、免疫和环境因素共同作用引起的复杂疾病<sup>[82]</sup>。病因具有高度异质性,为其研究增加了困难。但是,随着高通量技术的发展,POF遗传病因研究越来越全面,为早期预防提供了理论基础。同时,在治疗上,干细胞的应用也带给患者更多的选择。

### 3 小结与展望

总的来说,女性重要生殖障碍性疾病的发病机理十分复杂,是一系列因素共同作用的结果。各种疾病又有其自身的特点,因此针对每种疾病的研究策略有所不同。比如PCOS被认为是多基因遗传疾病,沿着GWAS的发现深入挖掘易感基因各自作用的同时,对众多基因的联合作用开展信号通路研究、生理功能聚类研究十分必要;而POF往往被认为是单基因致病,因此全外显子组测序在致病基因的筛选方面显示出一定的优势。与此同时,生殖疾病通常有家族聚集现象,即遗传因素在疾病的发生中起到重要作用,因此,基于家系寻找致病基因是一种行之有效的研究方法。

尽管在疾病的基础研究方面取得一定成果,但上述疾病的病因学和病理机制尚未完全解析,使得这些基础研究成果的临床转化进展缓慢。未来生殖疾病的分子机制研究面临重大挑战与机遇,可以利用多学科交叉与多种技术手段来进一步研究相关疾病,重点应用转化医学的思路,通过临床与基础研究的一体化研究模式,利用最新的基因组学、蛋白质组学等高通量技术手段,从细胞与分子层面进一步揭示疾病的分子机制,并积极探索与临床应用的结合点,为相关疾病的诊断和精准治疗提供服务。

### [参 考 文 献]

- [1] 国家中长期科学和技术发展规划纲要(2006—2020年). 2006年2月9日发布.
- [2] 发育与生殖研究国家重大科学研究计划“十二五”专项规划. 2012年5月14日发布.
- [3] 多囊卵巢综合征诊断中华人民共和国卫生行业标准. 中华妇产科杂志, 2012, 47: 74-5
- [4] Li R, Zhang Q, Yang D, et al. Prevalence of polycystic ovary syndrome in women in China: a large community-based study. Hum Reprod, 2013, 28: 2562-9
- [5] Cheung LP, Ma RC, Lam PM, et al. Cardiovascular risks and metabolic syndrome in Hong Kong Chinese women with polycystic ovary syndrome. Hum Reprod, 2008, 23: 1431-8
- [6] Dokras A, Clifton S, Futterweit W, et al. Increased prevalence of anxiety symptoms in women with polycystic

- ovary syndrome: systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril*, 2012, 97: 225-30e2
- [7] Joham AE, Ranasinha S, Zoungas S, et al. Gestational diabetes and type 2 diabetes in reproductive-aged women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 2014, 99: E447-52
- [8] de Groot PC, Dekkers OM, Romijn JA, et al. PCOS, coronary heart disease, stroke and the influence of obesity: a systematic review and meta-analysis. *Hum Reprod Update*, 2011, 17: 495-500
- [9] Teede H, Deeks A, Moran L. Polycystic ovary syndrome: a complex condition with psychological, reproductive and metabolic manifestations that impacts on health across the lifespan. *BMC Med*, 2010, 8: 41
- [10] Calogero AE, Calabro V, Catanuso M, et al. Understanding polycystic ovarian syndrome pathogenesis: an updated of its genetic aspects. *J Endocrinol Invest*, 2011, 34: 630-44
- [11] Deligeoroglou E, Kouskouti C, Christopoulos P. The role of genes in the polycystic ovary syndrome: predisposition and mechanisms. *Gynecol Endocrinol*, 2009, 25: 603-9
- [12] Kahsar-Miller MD, Nixon C, Boots LR, et al. Prevalence of polycystic ovary syndrome (PCOS) in first-degree relatives of patients with PCOS. *Fertil Steril*, 2001, 75: 53-8
- [13] Norman RJ, Masters S, Hague W. Hyperinsulinemia is common in family members of women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, 1996, 66: 942-7
- [14] Yildiz BO, Yarali H, Oguz H, et al. Glucose intolerance, insulin resistance, and hyperandrogenemia in first degree relatives of women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 2003, 88: 2031-6
- [15] Vink JM, Sadrzadeh S, Lambalk CB, et al. Heritability of polycystic ovary syndrome in a Dutch twin-family study. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91: 2100-4
- [16] Zhao H, Chen ZJ. Genetic association studies in female reproduction: from candidate-gene approaches to genome-wide mapping. *Mol Hum Reprod*, 2013, 19: 644-54
- [17] Huang Q. Genetic study of complex diseases in the post-GWAS era. *J Genet Genomics*, 2015, 42: 87-98
- [18] Chen ZJ, Zhao H, He L, et al. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for polycystic ovary syndrome on chromosome 2p16.3, 2p21 and 9q33.3. *Nat Genet*, 2011, 43: 55-9
- [19] Shi Y, Zhao H, Shi Y, et al. Genome-wide association study identifies eight new risk loci for polycystic ovary syndrome. *Nat Genet*, 2012, 44: 1020-5
- [20] Louwers YV, Stolk L, Uitterlinden AG, et al. Cross-ethnic meta-analysis of genetic variants for polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98: E2006-12
- [21] Eriksen MB, Brusgaard K, Andersen M, et al. Association of polycystic ovary syndrome susceptibility single nucleotide polymorphism rs2479106 and PCOS in Caucasian patients with PCOS or hirsutism as referral diagnosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2012, 163: 39-42
- [22] Eriksen MB, Nielsen MF, Brusgaard K, et al. Genetic alterations within the DENND1A gene in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS). *PLoS One*, 2013, 8: e77186
- [23] Goodarzi MO, Jones MR, Li X, et al. Replication of association of DENND1A and THADA variants with polycystic ovary syndrome in European cohorts. *J Med Genet*, 2012, 49: 90-5
- [24] Yoshimura S, Gerondopoulos A, Linford A, et al. Family-wide characterization of the DENN domain Rab GDP-GTP exchange factors. *J Cell Biol*, 2010, 191: 367-81
- [25] Allaire PD, Marat AL, Dall'Armi C, et al. The connecten DENN domain: a GEF for Rab35 mediating cargo-specific exit from early endosomes. *Mol Cell*, 2010, 37: 370-82
- [26] Marat AL, McPherson PS. The connecten family, Rab35 guanine nucleotide exchange factors interfacing with the clathrin machinery. *J Biol Chem*, 2010, 285: 10627-37
- [27] Strauss JF 3rd, McAllister JM, Urbanek M. Persistence pays off for PCOS gene prospectors. *J Clin Endocrinol Metab*, 2012, 97: 2286-8
- [28] McAllister JM, Modi B, Miller BA, et al. Overexpression of a DENND1A isoform produces a polycystic ovary syndrome theca phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: E1519-27
- [29] Cui L, Zhao H, Zhang B, et al. Genotype-phenotype correlations of PCOS susceptibility SNPs identified by GWAS in a large cohort of Han Chinese women. *Hum Reprod*, 2013, 28: 538-44
- [30] Wang F, Pan J, Liu Y, et al. Alternative splicing of the androgen receptor in polycystic ovary syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 4743-8
- [31] Comim FV, Teerds K, Hardy K, et al. Increased protein expression of LHCG receptor and 17 $\alpha$ -hydroxylase/17-20-lyase in human polycystic ovaries. *Hum Reprod*, 2013, 28: 3086-92
- [32] Troppmann B, Kossack N, Nordhoff V, et al. MicroRNA miR-513a-3p acts as a co-regulator of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor gene expression in human granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 390: 65-72
- [33] Mitri F, Bentov Y, Behan LA, et al. A novel compound heterozygous mutation of the luteinizing hormone receptor -implications for fertility. *J Assist Reprod Genet*, 2014, 31: 787-94
- [34] Wang P, Zhao H, Li T, et al. Hypomethylation of the LH/choriogonadotropin receptor promoter region is a potential mechanism underlying susceptibility to polycystic ovary syndrome. *Endocrinology*, 2014, 155: 1445-52
- [35] Zhu JQ, Zhu L, Liang XW, et al. Demethylation of LHR in dehydroepiandrosterone-induced mouse model of polycystic ovary syndrome. *Mol Hum Reprod*, 2010, 16: 260-6
- [36] Cowper-Sallari R, Zhang X, Wright JB, et al. Breast cancer risk-associated SNPs modulate the affinity of chromatin for FOXA1 and alter gene expression. *Nat Genet*, 2012, 44: 1191-8
- [37] Smemo S, Tena JJ, Kim KH, et al. Obesity-associated variants within FTO form long-range functional connections with IRX3. *Nature*, 2014, 507: 371-5

- [38] Cui L, Li G, Zhong W, et al. Polycystic ovary syndrome susceptibility single nucleotide polymorphisms in women with a single PCOS clinical feature. *Hum Reprod*, 2015, 30: 732-6
- [39] Nelson LM. Clinical practice. Primary ovarian insufficiency. *N Engl J Med*, 2009, 360: 606-14
- [40] De Vos M, Devroey P, Fauser BC. Primary ovarian insufficiency. *Lancet*, 2010, 376: 911-21
- [41] Simpson JL. Genetic and phenotypic heterogeneity in ovarian failure: overview of selected candidate genes. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1135: 146-54
- [42] Vujovic S. Aetiology of premature ovarian failure. *Menopause Int*, 2009, 15: 72-5
- [43] Qin Y, Jiao X, Simpson JL, et al. Genetics of primary ovarian insufficiency: new developments and opportunities. *Hum Reprod Update*, 2015, 21: 787-808
- [44] Powell CM, Taggart RT, Drumheller TC, et al. Molecular and cytogenetic studies of an X;autosome translocation in a patient with premature ovarian failure and review of the literature. *Am J Med Genet*, 1994, 52: 19-26
- [45] Jiao X, Qin C, Li J, et al. Cytogenetic analysis of 531 Chinese women with premature ovarian failure. *Hum Reprod*, 2012, 27: 2201-7
- [46] Devi A, Benn PA. X-chromosome abnormalities in women with premature ovarian failure. *J Reprod Med*, 1999, 44: 321-4
- [47] Wittenberger MD, Hagerman RJ, Sherman SL, et al. The FMR1 premutation and reproduction. *Fertil Steril*, 2007, 87: 456-65
- [48] Lourenco D, Brauner R, Lin L, et al. Mutations in NR5A1 associated with ovarian insufficiency. *N Engl J Med*, 2009, 360: 1200-10
- [49] Dixit H, Rao LK, Padmalatha VV, et al. Missense mutations in the *BMP15* gene are associated with ovarian failure. *Hum Genet*, 2006, 119: 408-15
- [50] Qin Y, Choi Y, Zhao H, et al. NOBOX homeobox mutation causes premature ovarian failure. *Am J Hum Genet*, 2007, 81: 576-81
- [51] Zhao H, Chen ZJ, Qin Y, et al. Transcription factor FIGLA is mutated in patients with premature ovarian failure. *Am J Hum Genet*, 2008, 82: 1342-8
- [52] Qin Y, Shi Y, Zhao Y, et al. Mutation analysis of NOBOX homeodomain in Chinese women with premature ovarian failure. *Fertil Steril*, 2009, 91: 1507-9
- [53] Qin Y, Jiao X, Dalgleish R, et al. Novel variants in the *SOHLH2* gene are implicated in human premature ovarian failure. *Fertil Steril*, 2014, 101: 1104-9 e6
- [54] Zhao S, Li G, Dalgleish R, et al. Transcription factor SOHLH1 potentially associated with primary ovarian insufficiency. *Fertil Steril*, 2015, 103: 548-53 e5
- [55] Zhao H, Qin Y, Kovanci E, et al. Analyses of GDF9 mutation in 100 Chinese women with premature ovarian failure. *Fertil Steril*, 2007, 88: 1474-6
- [56] Jiao X, Qin Y, Li G, et al. Novel *NR5A1* missense mutation in premature ovarian failure: detection in han Chinese indicates causation in different ethnic groups. *PLoS One*, 2013, 8: e74759
- [57] Qin Y, Zhao H, Kovanci E, et al. Analysis of LHX8 mutation in premature ovarian failure. *Fertil Steril*, 2008, 89: 1012-4
- [58] Qin Y, Zhao H, Kovanci E, et al. Mutation analysis of NANOS3 in 80 Chinese and 88 Caucasian women with premature ovarian failure. *Fertil Steril*, 2007, 88: 1465-7
- [59] Guo T, Qin Y, Jiao X, et al. FMR1 premutation is an uncommon explanation for premature ovarian failure in Han Chinese. *PLoS One*, 2014, 9: e103316
- [60] Zhao Z, Qin Y, Ma J, et al. *PTEN* gene analysis in premature ovarian failure patients. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 2011, 90: 678-9
- [61] Qin Y, Zhao H, Xu J, et al. Association of 8q22.3 locus in Chinese Han with idiopathic premature ovarian failure (POF). *Hum Mol Genet*, 2012, 21: 430-6
- [62] Qin Y, Vujovic S, Li G, et al. Ethnic specificity of variants of the *ESR1*, *HK3*, *BRSK1* genes and the 8q22.3 locus: no association with premature ovarian failure (POF) in Serbian women. *Maturitas*, 2014, 77: 64-7
- [63] Qin Y, Sun M, You L, et al. *ESR1*, *HK3* and *BRSK1* gene variants are associated with both age at natural menopause and premature ovarian failure. *Orphanet J Rare Dis*, 2012, 7: 5
- [64] Pierce SB, Gersak K, Michaelson-Cohen R, et al. Mutations in *LARS2*, encoding mitochondrial leucyl-tRNA synthetase, lead to premature ovarian failure and hearing loss in Perrault syndrome. *Am J Hum Genet*, 2013, 92: 614-20
- [65] Meduri G, Bachelot A, Duflos C, et al. FOXL2 mutations lead to different ovarian phenotypes in BPES patients: Case Report. *Hum Reprod*, 2010, 25: 235-43
- [66] Wang J, Zhang W, Jiang H, et al. Mutations in *HFMI* in recessive primary ovarian insufficiency. *N Engl J Med*, 2014, 370: 972-4
- [67] Caburet S, Arboleda VA, Llano E, et al. Mutant cohesin in premature ovarian failure. *N Engl J Med*, 2014, 370: 943-9
- [68] Wood-Trageser MA, Gurbuz F, Yatsenko SA, et al. MCM9 mutations are associated with ovarian failure, short stature, and chromosomal instability. *Am J Hum Genet*, 2014, 95: 754-62
- [69] AlAsiri S, Basit S, Wood-Trageser MA, et al. Exome sequencing reveals MCM8 mutation underlies ovarian failure and chromosomal instability. *J Clin Invest*, 2015, 125: 258-62
- [70] Qin Y, Guo T, Li G, et al. CSB-PGBD3 mutations cause premature ovarian failure. *PLoS Genet*, 2015, 11: e1005419
- [71] Guiraldelli MF, Eyster C, Wilkerson JL, et al. Mouse HFM1/Mer3 is required for crossover formation and complete synapsis of homologous chromosomes during meiosis. *PLoS Genet*, 2013, 9: e1003383
- [72] Snowden T, Acharya S, Butz C, et al. hMSH4-hMSH5 recognizes Holliday Junctions and forms a meiosis-specific sliding clamp that embraces homologous chromosomes. *Mol Cell*, 2004, 15: 437-51
- [73] Llano E, Gomez HL, Garcia-Tunon I, et al. *STAG3* is a strong candidate gene for male infertility. *Hum Mol Genet*,



- 2014, 23: 3421-31
- [74] Lutzmann M, Grey C, Traver S, et al. MCM8- and MCM9-deficient mice reveal gametogenesis defects and genome instability due to impaired homologous recombination. *Mol Cell*, 2012, 47: 523-34
- [75] Bailey AD, Gray LT, Pavelitz T, et al. The conserved Cockayne syndrome B-piggyBac fusion protein (CSB-PGBD3) affects DNA repair and induces both interferon-like and innate antiviral responses in CSB-null cells. *DNA Repair: Amst*, 2012, 11: 488-501
- [76] Dang Y, Zhao S, Qin Y, et al. MicroRNA-22-3p is down-regulated in the plasma of Han Chinese patients with premature ovarian failure. *Fertil Steril*, 2015, 103: 802-7 e1
- [77] La Marca A, Brozzetti A, Sighinolfi G, et al. Primary ovarian insufficiency: autoimmune causes. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 2010, 22: 277-82
- [78] Hoek A, van Kasteren Y, de Haan-Meulman M, et al. Analysis of peripheral blood lymphocyte subsets, NK cells, and delayed type hypersensitivity skin test in patients with premature ovarian failure. *Am J Reprod Immunol*, 1995, 33: 495-502
- [79] Silva CA, Yamakami LY, Aikawa NE, et al. Autoimmune primary ovarian insufficiency. *Autoimmun Rev*, 2014, 13: 427-30
- [80] Coccia ME, Rizzello F, Mariani G, et al. Ovarian surgery for bilateral endometriomas influences age at menopause. *Hum Reprod*, 2011, 26: 3000-7
- [81] Kokcu A. Premature ovarian failure from current perspective. *Gynecol Endocrinol*, 2010, 26: 555-62
- [82] Shamilova NN, Marchenko LA, Dolgushina NV, et al. The role of genetic and autoimmune factors in premature ovarian failure. *J Assist Reprod Genet*, 2013, 30: 617-22