

网络出版时间: 2020/5/29 13:04 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200527.1643.024.html>

◇ 临床医学研究 ◇

汉族人群中男性勃起功能障碍与色氨酸羟化酶 2 基因多态性的关系

付旭, 张贤生

摘要 目的 探讨色氨酸羟化酶 2 (TPH2) 基因多态性是否与勃起功能障碍 (ED) 是否相关。方法 招募 59 例确诊为 ED 的男性,另招募 151 例健康对照者。收集国际勃起功能指数-5 (IIEF-5) 和早泄诊断工具 (PEDT) 的数据。所有 ED 患者和健康对照组进行 TPH2 基因多态性的基因测序。统计分析单核苷酸多态性 (SNPs) 的等位基因频率和基因型频率在患者和对照组间的差异,以及不同遗传模型下的差异分析。结果 rs1007023 G 等位基因频率在 ED 患者中高于对照组,差异有统计学意义 ($P=0.023$)。结论 TPH2 基因的 SNPs rs1007023 在汉族人群中似乎与 ED 相关。携带 rs1007023 G 等位基因或 G/G + T/G 等位基因的男性患 ED 的可能性较大。

关键词 男性勃起功能障碍; 色氨酸羟化酶 2; 单核苷酸多态性

中图分类号 R 699

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)06-0947-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.06.024

勃起功能障碍 (erectile dysfunction, ED) 定义为持续或经常无法达到和/或维持阴茎勃起足以使性满意,包括令人满意的性行为的阴茎勃起,被认为是血管、神经源性、结构性、激素性、精神性疾病或由药物、创伤引起的疾病,损害了患者的社会心理和生活质量。近期有研究^[1]提示中国 ED 发病率为 41.6%,性焦虑影响 9%~25% 的男性,并导致早泄和心因性 ED^[2]。色氨酸羟化酶 2 基因 (tryptophan hydroxylase 2, TPH2) 基因是中枢 5-HT 合成中的限速酶,其浓度及活性影响 5-HT 的合成,TPH2 基因多态性影响其表达水平,进而调控中枢 5-HT 水平^[3]。目前 TPH2 基因的研究主要集中于精神疾病领域,被认为在包括抑郁症在内的许多精神疾病中

起着重要作用,但还没有关于 TPH2 基因多态性对 ED 影响的研究。该研究探究了该基因的 3'UTR、5'UTR、编码区和交界区的多态性与 ED 的关系。

1 材料与方法

1.1 病例资料 从安徽医科大学第一附属医院泌尿外科招募 59 例确诊为 ED 的男性,年龄 22~58 (30.59 ± 5.49) 岁;另从健康检查中心招募 151 例健康对照者,年龄 21~48 (30.52 ± 6.38) 岁,采集他们的外周血样本,并抽提基因组 DNA 保存备用。入选标准如下:在 21 岁以上的年龄中,与同一个女性伴侣保持稳定关系,并尝试至少 6 次,国际勃起功能指数 (international index of erectile function-5, IIEF-5) ≤ 21。排除标准如下:脊柱损伤或神经系统疾病史,生殖器外伤史或阴茎畸形;合并其他性功能障碍;性伴侣存在性功能障碍。提供参与研究的书面知情同意书。本研究经安徽医科大学第一附属医院伦理委员会批准。

1.2 TPH2 基因测序及统计分析

1.2.1 TPH2 基因测序 测序区域包括 TPH2 基因的完整编码区和调控区。调控基因组区域包括 5'非翻译区 (5'UTR)、3'非翻译区 (3'UTR) 和 15 bp 外显子-内含子交界区。利用 primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) 软件设计 TPH2 基因靶区的特异性引物,用 ABI 2720 热循环仪 (ABI2720, 美国应用生物系统公司) 进行扩增反应。所有 PCR 产物均由上海天昊生物科技公司采用 Illumina HiSeq 测序仪 (HiSeq, 美国亿明达公司) 2 × 150 双端测序模式进行高通量测序分析。

1.2.2 生物信息学及统计分析 使用 FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/FastQC/>) 对测序数据的质量进行评估,使用 Burrows-Wheeler 校准工具 v0.7.15-r1140 (<http://bio-bwa.sourceforge.net/>) 将序列比对到人类基因组参考序列 (UCSC hg19),生成 BAM 校准文件。使用 Picard v2.2.1 软件删除重复序列 ([2020-02-11 接收](https://broadin-</p></div><div data-bbox=)

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81571429)

作者单位: 安徽医科大学第一附属医院泌尿外科, 合肥 230032

作者简介: 付旭, 男, 硕士研究生;

张贤生, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者, E-mail: xiansheng-zhang@163.com

stitute. github. io/picard/) ,只有测序深度大于 10X 的碱基才能进行后续分析 ,使用 GATK 软件(https://software. broadinstitute. org/GATK/) 和 VarScan v2. 3. 9 软件(http://VarScan. sourceforge. net/) 对每个样本进行基因变异检测 ,使用 ANNOVAR 软件包(http://ANNOVAR. openbioinformatics. org/en/latest/) 对单核苷酸变异(single nucleotide variants , SNV) 进行功能注释 利用 PolyPhen-2、SIFT 和 MutationTaster 软件进行非同义和剪接位点变体的生物功能预测分析。连续变量和分类变量分别用 SPSS (22. 0 版) 进行 *t* 检验和非参数 Krukcal - Wallis 检验。常见单核苷酸多态性位点(single nucleotide polymorphism , SNP) 位点(MAF > 0. 05) 采用 Plink 软件(http://zzz. bwh. harvard. edu/plink/) 进行 Hardy-Weinberg 平衡(HWE) 检验及病例对照间的基因频率差异分析 ,利用 logistic 回归分析计算优势比(OR) 和 95% CI *P* < 0. 05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床资料分析 样本详细的人口统计学特征见表 1。 IIEF-5 评分在 ED 组与对照组之间差异有统计学意义(*P* < 0. 001) 。早泄诊断工具(premature ejaculation diagnostic tool , PEDT) 评分是评价射精功能的主观指标 ,ED 组 PEDT 与对照组无明显差异(*P* = 0. 088) 。年龄、体质指数以及教育程度均无明显差异。

2.2 TPH2 基因多态性统计分析 210 个 DNA 样本成功进行了基因测序 ,共得到 6 个最小等位基因频率 MAF > 0. 05 的 SNP 位点数据 ,SNP 位点详细信息见表 2。在校正了年龄、婚姻状况、身体质量指数和教育程度后 ,rs11178998、rs7305115、SNV019、rs17110747 位点的基因型分布及等位基因频率在 ED 组和对照组之间差异无统计学意义(*P* > 0. 05) 。

表 1 对照组与 ED 组临床资料分析($\bar{x} \pm s$)

临床信息	对照组		ED 组		<i>P</i> 值
	<i>n</i>	数据	<i>n</i>	数据	
年龄(岁)	151	30. 52 ± 6. 38	59	30. 59 ± 5. 49	0. 935
BMI(kg/m ²)	151	23. 24 ± 2. 72	59	23. 57 ± 3. 28	0. 494
IIEF-5	151	23. 6 ± 1. 1	59	12. 4 ± 4. 0	< 0. 001
PEDT	151	3. 60 ± 2. 64	59	4. 29 ± 2. 53	0. 088
教育程度(%)					0. 663
小学	52	34. 44	18	30. 51	
初中	44	29. 14	17	28. 81	
高中	49	32. 45	24	40. 68	
大学	6	3. 97	0	0	

rs1007023 是位于内含子 - 外显子交界区多态性 ,G 等位基因频率在 ED 患者中高于对照组 ,差异有统计学意义(*P* = 0. 023) ,见表 3。 ED 组和对照组在不同遗传模型下分析 ,显示 rs1007023 在显性模型下 ,G/G + T/G 等位基因型分布在 ED 组与对照组之间差异有统计学意义(*P* = 0. 028) ,提示 rs1007023 的 G/G + T/G 等位基因患 ED 可能性较大 ,见表 4。

3 讨论

Kulikova et al^[4] 通过使动物暴露在压力下产生抑郁大鼠模型 ,抑郁大鼠大脑 TPH2 的表达明显低于健康大鼠 ,应激可抑制 TPH2 在脑组织中的表达 ,降低 5-HT 的浓度 ,其机制可能与 TPH2 基因启动子的甲基化增加有关。 Wigner et al^[5] 研究表明 TPH2 基因 - 1449C > A 位点与抑郁症的发生有关 ,C 等位基因降低抑郁障碍发展的风险 ,支持了该通路参与抑郁症发病机制的假说。除此之外 ,ED 严重程度与 25(OH) D 呈正相关^[6] ,低水平的维生素 D 可能通过促进内皮功能障碍而增加 ED 的风险 ,患有 ED 的男性应该进行维生素 D 水平的分析 ,对于低维生素的 ED 患者 ,建议补充维生素 D^[7]。 维生素 D 激活大脑中一个 VDRE 处的 TPH2 的转录 ,诱

表 2 SNPs 位点信息表

单核苷酸多态性编号	等位基因		基因区域	预测氨基酸的改变	千人基因组数据库中中国汉族人群最小等位基因频率	本研究数据最小等位基因频率	哈代温伯格平衡检验 <i>P</i> 值
	1	2					
rs11178998	A	G	5'非翻译区	c. -52A > G	0. 192	0. 152	1. 000
rs7305115	A	G	外显子	exon7: c. 936A > G; p. P312P	0. 450	0. 455	0. 489
SNV019	A	G	内含子	c. 1068 + 23A > G	-	0. 075	0. 610
rs1007023	G	T	内含子	c. 1068 + 29G > T	0. 084	0. 105	0. 708
rs4290270	A	T	外显子	exon9: c. 1125A > T; p. A375A	0. 440	0. 470	0. 131
rs17110747	G	A	3'非翻译区	c. * 479G > A	0. 264	0. 244	0. 266

表3 ED组与对照组单核苷酸多态性位点关联分析结果

单核苷酸多态性编号	基因型	ED组	对照组	OR值(95% CI)	P值	等位基因	ED组	对照组	OR值(95% CI)	P值
rs11178998	G/G	1	4	0.7445(0.3948~1.404)	0.3621	G	16	46	0.7506(0.4024~1.4)	0.3672
	A/G	14	38				100	256		
	A/A	43	109							
rs7305115	G/G	11	36	0.9733(0.6301~1.503)	0.9030	G	54	139	0.9724(0.6248~1.513)	0.9013
	A/G	32	67				62	163		
	A/A	15	48							
SNV019	G/G	0	0	0.8314(0.3374~2.048)	0.6882	G	8	23	0.8441(0.3554~2.005)	0.7009
	A/G	8	23				108	271		
	A/A	50	124							
rs1007023	G/G	1	0	2.369(1.145~4.903)	0.0201	G	18	26	2.19(1.112~4.314)	0.02337
	T/G	16	26				100	276		
	T/T	42	125							
rs4290270	T/T	15	38	0.8971(0.5883~1.368)	0.6139	T	54	142	0.8882(0.5717~1.38)	0.5978
	A/T	24	66				62	160		
	A/A	19	47							
rs17110747	A/A	6	10	1.006(0.6209~1.631)	0.9795	A	29	75	1.007(0.6095~1.663)	0.9787
	G/A	17	55				89	227		
	G/G	36	86							

表4 SNPs位点在ED组与对照组中不同遗传模型下的关联分析结果

显性遗传模型	隐性遗传模型					单核苷酸多态性位点编号				
	基因型	ED组	对照组	OR值(95% CI)	P值	基因型	ED组	对照组	OR值(95% CI)	P值
rs11178998	G/G + A/G	15	42	0.7354(0.3625~1.492)	0.3944	G/G	1	4	0.5452(0.05627~5.282)	0.6006
	A/A	43	109			A/A + A/G	57	147		
rs7305115	G/G + A/G	43	103	1.326(0.6592~2.666)	0.4290	G/G	11	36	0.6471(0.2929~1.43)	0.2819
	A/A	15	48			A/A + A/G	47	115		
SNV019	G/G + A/G	8	23	0.8314(0.3374~2.048)	0.6882	G/G	0	0	-	-
	A/A	50	124			A/A + A/G	58	147		
rs1007023	G/G + T/G	17	26	2.327(1.097~4.937)	0.02767	G/G	1	0	-	-
	T/T	42	125			T/T + T/G	58	151		
rs4290270	T/T + A/T	39	104	0.8306(0.4246~1.625)	0.5878	T/T	15	38	0.8995(0.4365~1.854)	0.7740
	A/A	19	47			A/A + A/T	43	113		
rs17110747	A/A + G/A	23	65	0.8682(0.4643~1.624)	0.6583	A/A	6	10	1.623(0.5487~4.803)	0.3813
	G/G	36	86			G/G + G/A	53	141		

导大脑 TPH2 的表达,从而选择性地增强中枢血清素^[8]。如前所述,多种精神心理疾病影响甚至导致 ED 的发生,而 TPH2 被认为包括抑郁症在内的许多精神疾病中起着重要作用,因此 TPH2 可能与男性勃起功能相关,而本实验结果证实了 ED 与 TPH2 多态性相关,显示 TPH2 的 SNP rs1007023 中 G 等位基因可能为勃起功能障碍的危险性因素。rs1007023 位点位于 TPH2 基因 8 号内含子,在 RegulomeDB (<http://regulomedb.org>) 数据库中查询,rs1007023 位点的 RegulomeDB score 为 5,这个评分说明 rs1007023 可能与转录调控关系不大。因此课题组又在 HaploReg v4.1 数据库([\[tute.org/mammals/haploreg/haploreg.php\]\(http://pubs.broadinsti-tute.org/mammals/haploreg/haploreg.php\)\) 中查询 rs1007023 位点在亚洲人群中的连锁位点的调控功能数据,发现有 33 个 SNP 位点与 rs1007023 的连锁 \$r^2 > 0.8\$,其中有 3 个位点\(rs1843809、rs10748187、rs6582081\)为保守位点,其中 rs1843809 在 RegulomeDB 数据库的评分是 3a,并且位于 HOXC-8 转录因子的 motif 内,具有很强的调控证据,有 2 个位点\(rs10784942、rs4760749\)是转录因子结合位点,rs4760749 位点同时与 DHS、Enhance 区域重叠,这 2 个位点在 RegulomeDB 数据库的评分分别是 4 A,可能结合 GATA3、ERLPH2_A、P300 等转录因子,从而调控 TPH2 基因的转录表达,有 5 个 SNP 位点有](http://pubs.broadinsti-</p>
</div>
<div data-bbox=)

调控转录因子结合 motif 改变的提示数据,有 14 个位点包括 rs1007023 位点均有 eQTL 的证据,综上所述 rs1007023 及其连锁位点可能参与调控 TPH2 基因的表达,从而与 ED 的发生有所关联,但 rs1007023 对勃起功能障碍的确切影响有待进一步研究,当然本研究也存在一些局限性,如研究样本量较小,其次中国 ED 患者超过 50 岁的男性由于尴尬甚至觉得年龄大 ED 是正常现象,可能较少到本院门诊就诊,因此应该考虑潜在的抽样偏倚,需要进一步扩大样本量的研究,如多中心招募更多的 ED 患者,以确认和扩展研究结果。

综上所述,本研究是首次研究 TPH2 多态性与 ED 的关系。结果表明 rs1007023 的等位基因及基因型频率与 ED 有相关性,差异有统计学意义。携带 rs1007023 G 等位基因或 G/G + T/G 等位基因的男性患 ED 的可能性较大,进一步的基因研究是必要的。

参考文献

[1] Aita G, Ros C T D, Lorenzini F, et al. Erectile dysfunction: drug

treatment[J]. *Rev Assoc Med Bras* (1992), 2019, 65(9): 1133-42.

- [2] Goldstein I, Goren A, Li V W, et al. Epidemiology update of erectile dysfunction in eight countries with high burden [J]. *Sex Med Rev* 2020, 8(1): 48-58.
- [3] Prasad P, Ogawa S, Parhar I S. Serotonin reuptake inhibitor citalopram inhibits GnRH synthesis and spermatogenesis in the male zebrafish [J]. *Biol Reprod*, 2015, 93(4): 102.
- [4] Kulikova E A, Kulikov A V. Tryptophan hydroxylase 2 as a therapeutic target for psychiatric disorders: focus on animal models [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2019, 23(8): 655-67.
- [5] Wigner P, Czarny P, Synowiec E, et al. Association between single nucleotide polymorphisms of TPH1 and TPH2 genes, and depressive disorders [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(3): 1778-91.
- [6] Culha M G, Atalay H A, Canat H L, et al. The relationship between erectile dysfunction severity, mean platelet volume and vitamin D levels [J]. *Aging Male*, 2018, 4: 1-6.
- [7] Barassi A, Pezzilli R, Colpi G M, et al. Vitamin D and erectile dysfunction [J]. *Sex Med*, 2014, 11(11): 2792-800.
- [8] Kaneko I, Sabir M S, Dussik C M, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D regulates expression of the tryptophan hydroxylase 2 and leptin genes: implication for behavioral influences of vitamin D [J]. *FASEB J*, 2015, 29(9): 4023-35.

Association between erectile dysfunction and polymorphisms of the tryptophan hydroxylase 2 gene in Han population

Fu Xu Zhang Xiansheng

(Dept of Urology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate whether the polymorphism of tryptophan hydroxylase 2 (TPH2) gene is associated with erectile dysfunction (ED). **Methods** A total of 59 men diagnosed with ED and 151 healthy controls were recruited. International index of erectile function-5 (IIEF-5) and the premature ejaculation diagnostic tool (PEDT) data were collected. All ED patients and healthy controls were genotyped for polymorphisms in the TPH2 gene. Allele and genotype frequencies of single nucleotide polymorphisms (SNPs) were compared between the patients and controls. **Result** The rs1007023 G allele frequency was significantly higher in ED patients than that in the control group ($P=0.023$). **Conclusion** The SNPs rs1007023 of the TPH2 gene seems to be associated with ED in males with the rs1007023 G allele or G/G + T/G allele in the Han population.

Key words erectile dysfunction; tryptophan hydroxylase 2; single nucleotide polymorphisms