

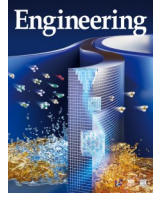


ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng



Research
Clinical Engineering—Article

多囊卵巢综合征无排卵的胰岛素信号和雄激素合成的新遗传风险和代谢特征

吴效科^{a,b,*}, 黄志超^{c,d,#}, 曹义娟^{e,#}, 李建^f, 李志强^{g,h}, 马红丽^a, 高敬书^a, 常惠^a, 张多加^a, 丛晶^a, 王宇^a, 吴奇ⁱ, Xiaoxiao Han^{j,k}, Pui Wah Jacqueline Chung^c, Yiran Li^c, 郑煦^c, 陈玲熙^l, Lin Zeng^m, Astrid Borchertⁿ, Hartmut Kuhnⁿ, 陈子江^o, Ernest Hung Yu Ng^p, Elisabet Stener-Victorin^q, 张和平^r, Richard S. Legro^s, Ben Willem J. Mol^{t,u}, 师咏勇^{h,*}

^a The First Affiliated Hospital, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China

^b Department of Reproductive Medicine, Heilongjiang Provincial Hospital, Harbin Institute of Technology, Harbin 150030, China

^c Department of Obstetrics and Gynaecology, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong 999077, China

^d Reproduction and Development Laboratory, Li Ka Shing Institute of Health Sciences, Chinese University of Hong Kong-Sichuan University Joint Laboratory in Reproductive Medicine, The Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, 999077, China

^e Center for Reproductive Medicine, Xuzhou Central Hospital, Xuzhou 221009, China

^f Department of Obstetrics and Gynecology, The Affiliated Hospital of Gui Zhou Medical University, Guiyang 550004, China

^g Biomedical Sciences Institute, The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266000, China

^h Key Laboratory for the Genetics of Developmental and Neuropsychiatric Disorders, Bio-X Institutes, Ministry of Education, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200001, China

ⁱ Department of Obstetrics and Gynecology, Obstetrics and Gynecology Hospital, Fudan University, Shanghai 200001, China

^j Clinical and Translational Research Center of Shanghai First Maternity and Infant Hospital, Shanghai 200001, China

^k Shanghai Key Laboratory of Signaling and Disease Research, Frontier Science Center for Stem Cell Research, School of Life Sciences and Technology, Tongji University, Shanghai 200001, China

^l Department of Computer Sciences, City University of Hong Kong, Hong Kong 999077, China

^m Shanghai NewCore Biotechnology Co., Ltd., Shanghai 200001, China

ⁿ Institute of Biochemistry, Charité—University Medicine Berlin & Free University Berlin & Humboldt University Berlin & Berlin Institute of Health, Berlin 10099, Germany

^o Center for Reproductive Medicine, Shandong Provincial Hospital, Shandong University, Jinan 250100, China

^p Department of Obstetrics and Gynaecology, The University of Hong Kong, Hong Kong 999077, China

^q Department of Physiology and Pharmacology, Karolinska Institutet, Stockholm 10044, Sweden

^r Department of Biostatistics, Yale School of Public Health, New Haven, CT 06510, USA

^s Department of Obstetrics and Gynecology, Pennsylvania State University, Hershey, PA 17033, USA

^t Department of Obstetrics and Gynaecology, Monash University, Monash Medical Centre, Clayton, VIC 3168, Australia

^u Aberdeen Centre for Women's Health Research, School of Medicine, Medical Sciences and Nutrition, University of Aberdeen, Aberdeen AB25 2ZD, UK

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 June 2022

Revised 17 August 2022

Accepted 28 August 2022

Available online 14 October 2022

关键词

多囊卵巢综合征

不孕症

排卵反应

ZNF438

REC114

全外显子测序

深度机器学习

摘要

促排卵是多囊卵巢综合征(PCOS)不孕症的一线治疗方案。(卵巢)对促排卵治疗的排卵应答差被认为与胰岛素抵抗和高雄激素血症相关。在一个包含1000名PCOS不孕妇女(PCOSA_{act})的前瞻性队列中,我们开展了一项全外显子联合靶向单核苷酸多态性(SNP)测序以及代谢组学研究。在全基因组水平找出与无排卵显著相关的常见变异和罕见突变,并通过机器学习算法构建排卵预测模型。研究发现,ZNF438基因中标记为rs2994652($p = 2.47 \times 10^{-8}$)的常见变异和REC114基因中的一个罕见功能突变(rs182542888, $p = 5.79 \times 10^{-6}$)与促排卵治疗失败显著相关。携带rs2994652 A等位基因和REC114 p.Val101Leu(rs182542888)的PCOS不孕妇女进行促排卵治疗的总排卵率更低[分别为:比值比(OR)=1.96,95%置信区间(CI)=1.55~2.49;OR=11.52,95% CI=3.08~43.05],出现排卵的间隔时间更长(平均56.7天 vs.49.0天, $p < 0.001$;78.1 vs.68.6天, $p = 0.014$)。对于rs2994652突变者,L-苯丙氨酸水平升高并与胰岛素抵抗稳态模型(HOMA-IR)指数($r = 0.22, p = 0.05$)和空腹血糖($r = 0.33, p = 0.003$)呈正相关;对于rs182542888突变者,花生四烯酸代谢产物水平下降并与升高的抗苗勒管激素($r = -0.51, p = 0.01$)和总睾酮($r = -0.71, p = 0.02$)呈负相关。整合基因变异位点、代谢产物及临床特征的联合预测模型可提高对排卵的预测能力

* Corresponding authors.

E-mail addresses: xiaokewu2002@vip.sina.com (X. Wu), shiyongyong@gmail.com (Y. Shi).

#These authors contributed equally to this work.

2095-8099/© 2022 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

英文原文:Engineering, 2023, 23(4): 103–111

引用本文: Xiaoke Wu, Chi Chiu Wang, Yijuan Cao, Jian Li, Zhiqiang Li, Hongli Ma, Jingshu Gao, Hui Chang, Duoqia Zhang, Jing Cong, Yu Wang, Qi Wu, Xiaoxiao Han, Pui Wah Jacqueline Chung, Yiran Li, Xu Zheng, Lingxi Chen, Lin Zeng, Astrid Borchert, Hartmut Kuhn, Zi-jiang Chen, Ernest Hung Yu Ng, Elisabet Stener-Victorin, Heping Zhang, Richard S. Legro, Ben Willem J. Mol, Yongyong Shi. Novel Genetic Risk and Metabolic Signatures of Insulin Signaling and Androgenesis in the Anovulation of Polycystic Ovary Syndrome. *Engineering*, <https://doi.org/10.1016/j.eng.2022.08.013>

[曲线下面积(AUC)=76.7%]。ZNF438基因的一个常见变异和REC114基因的一个罕见功能突变,以及与二者相关的苯丙氨酸和花生四烯酸代谢物改变,与PCOS女性不孕症的促排卵治疗失败相关。

©2022 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

多囊卵巢综合征 (polycystic ovary syndrome, PCOS) 是一种生殖和代谢性疾病,全世界约5%~10%的育龄期女性受影响。PCOS患者可罹患月经异常、多毛、胰岛素抵抗、代谢综合征和不孕症等[1]。由于无排卵或稀发排卵,高达80%的PCOS女性合并不孕症[2]。遗传因素在PCOS的发病中起着重要作用,这已被家族聚集性研究和双胞胎姐妹研究所证实[3]。目前,通过基于阵列的全基因组关联研究鉴别出与PCOS发病相关的候选基因超过200个,涉及性激素、胰岛素功能和钙信号、氧化应激和内噬作用等[4-6]。

芳香化酶抑制剂和选择性雌激素受体调节剂被用作诱导排卵的一线治疗。然而,10%~40%的PCOS女性对这些药物治疗无应答[7-8]。排卵应答差仍然是PCOS不孕妇女临床促排卵治疗面临的一个巨大挑战。目前,对于不孕症治疗失败的病因认知有限,也缺乏有效的筛查标志物或普遍适用的预测模型用以选择PCOS不孕症的治疗方案。

排卵应答可受到遗传和代谢因素以及胰岛素信号和类固醇合成所介导的某些临床特征共同影响[9]。在本研究中,我们旨在评估无排卵PCOS女性的遗传变异、代谢信号和临床特征。我们采用全外显子联合靶向单核苷酸多态性 (single-nucleotide polymorphism, SNP) 测序和全基因组学技术,以期找出不孕症治疗中与排卵应答相关的重要的新遗传变异及其代谢信号特征。

2. 材料和方法

2.1. 研究设计、人群和方案

本研究中使用的血液样本均来自PCOSAct研究,后者在2012年7月6日至2014年11月18日期间从27家医院(分中心)共招募1000名不孕PCOS女性,这些女性分别接受克罗米芬或安慰剂联合针灸或“假”针灸治疗[9-10]。这些分中心在地理位置上位于中国南方和北方,数量分别为11个和10个。依据修订的鹿特丹标准,所有受

试者均符合PCOS诊断标准,即月经稀发或闭经(月经周期分别大于35天和90天)和临床(中国人群:修订的Ferriman-Gallwey多毛评分 ≥ 5)/生化高雄[总睾酮水平(TT) $>1.67 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$]表现,或多囊卵巢[一侧卵巢内见大于12个小卵泡(直径小于9 mm),或卵巢体积大于10 mL],或两者同时存在。该试验获伦理委员会批准,并在ClinicalTrials.gov (NCT01573858)和chictr.org.cn (ChiCTR-TRC-12002081)网站注册。

PCOSAct依据《赫尔辛基宣言》原则开展,并获得黑龙江中医药大学第一附属医院伦理委员会批准。该试验在获得伦理委员会批准后开展。受试者被告知研究的获益和风险,她们被允许在任何时候以任意理由自愿地停止参与研究。在PCOSAct研究中,所有受试者均提供了本研究使用血液样本的知情同意。

2.2. 全外显子联合靶向SNP测序

采用Flexi基因DNA试剂盒提取DNA,根据制造商的使用说明进行操作。采用琼脂糖凝胶电泳法测定样品的完整性、浓度和纯度。纯化的基因组DNA(大于0.4 μg)用于构建文库,并根据Dynege制造商手册(<http://www.dynege.com/>),使用QuarXeq人类全外显子组1.0 plus 200 K SNPs试剂盒进行蛋白质编码序列富集。样品通过Illumina NGS系统进行测序。原始数据依据gatk4-germline-snps-indels工作流程进行处理。简而言之,我们使用基因组分析工具包(GATK)软件v4.1.2.0将多对输入的原始数据(FASTQ文件)转换为一个未映射的BAM文件。保留SNP和观测值的质量控制参数如下:SNP缺失 <0.05 (样本删除前),观测值缺失 <0.02 ,常染色体杂合度偏差(Fhet <0.2),SNP缺失 <0.02 (样本删除后),病例和对照间SNP缺失的差异 <0.02 ,以及SNP的哈迪-温伯格平衡检验($p > 1 \times 10^{-6}$)。采用血缘同源方法计算亲缘关系,每一配对的相关个体之一($\text{pi_hat} > 0.2$)均被剔除。具有统计学显著性的变异被进一步通过独立基因分型实验验证。

2.3. 代谢组学分析

采用超高效液相色谱 (ultra performance liquid chro-

matography, UPLC) 法测定血清代谢谱, 并输入 Progenesis QI 软件 (Waters, USA) 进行数据预处理。对峰进行匹配、提取和归一化后, 对离子进行归一化。根据排卵结果对所有离子进行严格的层次聚类和判别分析。采用稀疏偏最小二乘分析确定各离子对聚类的贡献值。基于归一化数据, 采用 t 检验对组间差异进行检测。选择组间比较具有统计学显著性的离子作为候选离子, 进行元素匹配、二次鉴定。使用人类代谢组数据库 (HMDB) 和代谢分析网站估计可能贡献 (该离子) 的代谢物。基于 Masslynx 软件系统的质量片段软件, 输入获得的化合物和二次质谱数据, 通过热解质谱数据和化学结构裂解可能性数据, 证实代谢物的有效性。基因和基因组京都百科全书 (KEGG) 用于分析代谢通路。与变异/突变相关的显著代谢物被认为是组成排卵的代谢信号, 并通过针对二十烷小体的定量液相色谱/串联质谱 (LC-MS/MS) 方法进行验证 (附录 A 中的 S1 节)。

2.4. 机器学习和预测模型

PCOSA 在 27 家医院开展, 包括中医院和西医院。共从中医院和西医院分别招募 612 名和 367 名患者。中医院和西医院的受试者之间所有临床结局均无显著差异。在机器学习中, 来自中医院的受试者数据被用作训练集和内部验证集, 而来自西医院的受试者数据则用作外部验证集。我们基于选择的特征构建了排卵预测模型, 包括纳入或不纳入多基因风险评分 (polygenic risk score, PRS) 和风险基因型及相关联的代谢物特征以及它们的组合。首先采用线性回归 (linear regression, LR) 模型预测排卵, 然后将其与不同算法的结果进行比较, 包括支持向量机 (support vector machine, SVM)、 K -最近邻 (K -nearest neighbor, KNN)、随机森林 (random forest, RF)、梯度增强决策树 (gradient boosted decision tree, GBDT) 和神经网络 (neural network, NN) 等。在训练中, 采用留一交叉验证测试法进行模型参数剪枝。模型训练结束后, 分别进行内部验证和外部验证。所有模型都会生成 0 到 1 区间并呈正态分布的排卵概率。我们将概率小于 0.5 的受试者划分为低排卵概率者; 否则, 受试者被划分为高排卵概率者。我们使用 R 语言 “caret” 包进行训练和预测任务, 将 LR、SVM、KNN、RF、GBDT 和 NN 模型的模型参数分别设置为 “bayesglm” “svmLinear” “KNN” “rf” “avNN” “gbm” 和 “avNNNet”。我们使用受试者工作特征 (ROC) 曲线 [曲线下面积 (AUC)]、准确性、敏感性、特异性、阳性预测值 (PPV)、阴性预测值 (NPV)、F1 评分、Cohen’s Kappa 系数 (Kappa) 和 Brier 评分来评估模型的预测

性能。我们使用 R 语言 “caret” 包中的 “varImp” 函数计算特征的重要性。

2.5. 统计分析

对于常见变异关联分析, 使用 Rapid imputation for COntortias PipeLine (RICOPILI) 软件进行标准质量控制、数据填补和统计分析 [11]。基因型推断采用 Eagle v2.3.5 [11] 中嵌入的预分期/逐步填补法和使用 Minimac3 [12] 软件进行, 后者使用 1000 个三阶段基因作为参照 [13]。对常见变异分析, 全基因组显著性阈值设置为 5.0×10^{-8} 。使用 EIGENST RAT v8 [14] 软件结合研究样本和第三个国际人类基因组单体型图项目样本生成主成分。对罕见变异分析, 使用 GATK 锁定高质量变异并标记为 PASS。使用变异效应预测器 (Ensembl variant effect predictor, VEP) 对变异进行注释。罕见致病变异 (最小等位基因频率 < 0.01) 被定义为 Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT) 评分 < 0.05 和 Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen-2) > 0.8 , 或 Combined Annotation-Dependent Depletion (CADD) > 20 。使用 RVTESTS 对致病变异进行单一变异检验和负担检验 [15], 统计显著性水平分别设为 5.13×10^{-7} (0.05/97453) 和 2.97×10^{-6} (0.05/16804)。所有这些变异与排卵的遗传关联性统计分析都纳入治疗措施进行校正, 包括针灸。

临床数据的连续变量采用平均值 [标准差 (standard deviation, SD)] 描述, 分类变量采用频率 (%) 描述。两组间差异比较采用 Mann-Whitney- U 检验或 χ^2 检验, 多组间差异比较采用 Kruskal-Wallis 检验。采用 Kaplan-Meier 曲线评估首次排卵时间与风险基因型之间的关联性, 并计算平均排卵时间。采用 Spearman’s 分析代谢物与生化参数之间的相关性。使用深度机器学习算法中的逻辑构建排卵预测模型, 并进行验证 (附录 A 中的 S1 节)。双尾 p 值小于 0.05, 被定义为具有统计显著性, 所有统计学分析均使用 R3.6.1 版本完成。

3. 结果

3.1. 研究人群特征

共 979 份和 936 份血样本可分别用于基因组测序和代谢组学分析 (附录 A 中的图 S1)。受试者的基线人口学特征在克罗米芬组和安慰剂组之间无显著差异。接受克罗米芬治疗的受试者的排卵率 (90.8% vs. 66.0%, $p < 0.001$)、受孕率 (42.6% vs. 21.6%, $p < 0.001$)、临床妊娠率 (29.1% vs. 15.1%, $p < 0.001$) 和活产率 (27.3% vs. 14.3%,

$p < 0.001$) 显著高于接受安慰剂治疗者 (表1)。

本研究样本的遗传背景与中国汉族和日本人群一致, 但显著异于欧洲和非洲人群 (附录A中的图S2)。在全部研究女性中发现两个与排卵显著相关的位点, 即位于 *ZNF438* 10p11.23 位点的一个常见变异 rs2994652 [A 等位

基因比值比 (OR) = 1.96, 95% CI = 1.55~2.49, 逻辑回归校正 $p = 2.47 \times 10^{-8}$] 和 *REC114* 的一个罕见变异 rs182542888 (pVal101Leu, OR = 11.52, 95% CI = 3.08~43.05, 评分检验 $p = 5.79 \times 10^{-6}$) (图1、附录A中的图S3和表S1至表S3)。
ZNF438 的另两个常见变异 rs57718262 ($p = 2.84 \times 10^{-7}$) 和

表1 基线人口学特征[数值用均值(标准差,SD)表示,除非另有说明]

Characteristics	Clomiphene ($n = 488$)	Placebo ($n = 491$)	Total ($n = 979$)	p values ^a
Age (years)	27.97 (3.36)	27.86 (3.25)	27.91 (3.31)	0.50
Height (cm)	161.20 (5.07)	161.22 (5.15)	161.21 (5.11)	0.43
Weight (kg)	62.71 (11.95)	63.47 (12.96)	63.09 (12.47)	0.43
BMI ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-2}$)	24.06 (4.06)	24.36 (4.46)	24.21 (4.26)	0.42
Waist circumference (cm)	85.17 (11.29)	85.63 (11.78)	85.40 (11.53)	0.57
Hip circumference (cm)	98.11 (8.78)	98.73 (8.55)	98.42 (8.67)	0.30
Mean menstrual cycle per year	6.17 (1.98)	6.21 (2.19)	6.19 (2.09)	0.78
Mean menstrual interval (day)	70.16 (46.67)	68.86 (39.44)	69.51 (43.17)	0.76
Infertility duration (month)	23.77 (17.67)	24.04 (17.63)	23.91 (17.64)	0.76
Pause (beats per minute)	75.95 (5.99)	76.19 (6.50)	76.07 (6.25)	0.71
Systolic blood pressure (mmHg)	112.26 (9.64)	112.27 (9.17)	112.26 (9.40)	0.82
Diastolic blood pressure (mmHg)	74.82 (7.97)	74.78 (7.77)	74.80 (7.87)	0.88
Modified F-G score	2.96 (2.57)	3.11 (3.00)	3.03 (2.80)	0.95
Acne score	0.42 (0.75)	0.46 (0.78)	0.44 (0.76)	0.38
Acanthosis score	1.20 (0.46)	1.21 (0.48)	1.21 (0.47)	0.70
Left ovary antral follicle count	11.88 (2.83)	12.19 (3.18)	12.04 (3.01)	0.06
Right ovary antral follicle count	11.93 (2.67)	12.24 (2.95)	12.08 (2.82)	0.05
Polycystic ovary morphology (n (proportion))	426 (87.3%)	440 (89.6%)	866 (88.5%)	0.30
LH ($\text{IU} \cdot \text{L}^{-1}$)	10.30 (6.08)	10.69 (5.80)	10.50 (5.94)	0.14
Follicle stimulating hormone ($\text{IU} \cdot \text{L}^{-1}$)	6.12 (1.66)	6.07 (1.66)	6.10 (1.66)	0.47
Estradiol ($\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	284.32 (370.86)	255.31 (254.55)	269.83 (318.29)	0.95
Progesterone ($\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	2.52 (4.68)	2.65 (5.50)	2.58 (5.10)	0.99
TT ($\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	1.67 (0.66)	1.66 (0.64)	1.66 (0.65)	0.96
Free testosterone ($\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	2.28 (0.81)	2.30 (0.88)	2.29 (0.84)	0.91
Sex hormone binding globulin ($\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	43.37 (29.48)	41.92 (31.51)	42.65 (30.50)	0.09
AMH ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	12.00 (6.63)	11.97 (6.09)	11.99 (6.36)	0.73
FAI	5.53% (4.04%)	6.17% (4.78%)	5.85% (4.43%)	0.16
Fasting insulin ($\text{pmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	96.50 (94.18)	95.82 (82.50)	96.16 (88.51)	0.44
Glucose ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	4.98 (0.94)	5.11 (1.02)	5.05 (0.98)	0.10
Total cholesterol ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	4.69 (1.12)	4.80 (1.05)	4.74 (1.09)	0.06
Triglyceride ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	1.53 (0.85)	1.61 (0.96)	1.57 (0.91)	0.37
High-density lipoprotein ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	1.28 (0.39)	1.28 (0.36)	1.28 (0.37)	0.80
Low-density lipoprotein ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	2.94 (0.90)	3.00 (0.85)	2.97 (0.88)	0.14
Fertility outcomes after treatment (n (proportion))				
Ovulation	443 (90.8%)	324 (66.0%)	767 (78.3%)	< 0.001
Conception	208 (42.6%)	106 (21.6%)	314 (32.1%)	< 0.001
Clinical Pregnancy	142 (29.1%)	74 (15.1%)	216 (22.1%)	< 0.001
Live birth	133 (27.3%)	70 (14.3%)	203 (20.7%)	< 0.001
Pregnancy loss	71 (34.8%)	35 (33.3%)	106 (34.3%)	0.80

^a Clomiphene vs placebo

IU: international unit; BMI: body mass index; FAI: free androgen index; LH: luteinizing hormone; 1 mmHg = 133.3 Pa.

rs34486207 ($p = 1.16 \times 10^{-6}$) 则分别与克罗米芬组和安慰剂组的排卵显著相关 (附录 A 中的图 S4、图 S5、表 S1)。在全部研究女性和接受克罗米芬治疗女性中, 如果携带任一 *REC114* 风险等位基因和 *ZNF438* rs2994652 风险等位基因, 观察到的无排卵风险可分别升高 1.96 倍和 2.47 倍 (附录 A 中的表 S4)。这些变异与其他妊娠结局的关联性未达到全基因组显著性。

3.2. 遗传变异对第一次排卵时间的影响

携带 *ZNF438* rs2994652 [图 2 (a)] 或 *REC114* rs182542888 [图 2 (b)] 等位基因的女性的第一次排卵时间显著延长, 平均排卵时间在全部研究女性中分别为 56.7 天 vs. 49.0 天和 78.1 vs. 68.6 天, 在接受克罗米芬治疗女性中分别为 42.0 天 vs. 36.1 天和 71.6 天 vs. 39.5 天, 在安慰剂治疗者分别 71.1 天 vs. 63.5 天和 113.0 天 vs. 68.9 天。对于携带 *ZNF438* rs34486207 和 rs57718262 的女性也是如此 (附录 A 中的图 S6)。

3.3. *ZNF438* 蛋白表达与临床特征

在所有研究女性、克罗米芬组及安慰剂组中, 与无排卵女性相比较, 排卵女性有着更低的体重指数 (BMI)、总睾酮 (TT)、抗苗勒管激素 (anti-Müllerian hormone, AMH)、游离雄激素指数 (free androgen index, FAI) 及

rs2994652 和 rs182542888 频率和更多月经周期性及更高激素结合球蛋白 (sex hormone-binding globulin, SHBG) 水平 (附录 A 中的表 S5)。对接受克罗米芬治疗女性, 与无排卵者相比, 排卵女性有着更低的收缩压、黑棘皮症评分、空腹胰岛素和甘油三酯, 而接受安慰剂治疗的排卵女性的促黄体生成素 (luteinizing hormone, LH) 水平更低。与健康对照组相比, *ZNF438* 和 *REC114* 蛋白表达水平在 PCOS 女性的卵巢中均降低 (附录 A 中的图 S7)。

3.4. 代谢组学特征

在聚类分析中根据排卵应答鉴别出一组基线代谢物 (附录 A 中的图 S8)。基于 rs2994652 和 rs182542888 等位基因, 这些代谢物被富集到苯丙氨酸/酪氨酸/色氨酸生物合成途径 (hsa00400) 和花生四烯酸代谢途径 (hsa00590) (附录 A 中的图 S9 至图 S11)。携带 *ZNF438* 突变的女性, 血清 L-苯丙氨酸、4-羟基苯丙酮酸、吲哚和 3-羟基苯甲酸等代谢产物水平显著升高。携带 *REC114* 突变的女性, 血清花生四烯酸、白三烯和前列腺素等代谢产物水平显著降低, 而氢过氧化物等水平则显著升高 (图 3)。在携带 *ZNF438* 突变女性中, L-苯丙氨酸与稳态模型评估 (HOMA-IR; $r = 0.219, p = 0.049$) 的胰岛素抵抗指数和空腹血糖 ($r = 0.326, p = 0.003$) 水平呈正相关, 而与 SHBG ($r = -0.268, p = 0.015$) 呈负相关。在携带 *REC114* 突变的

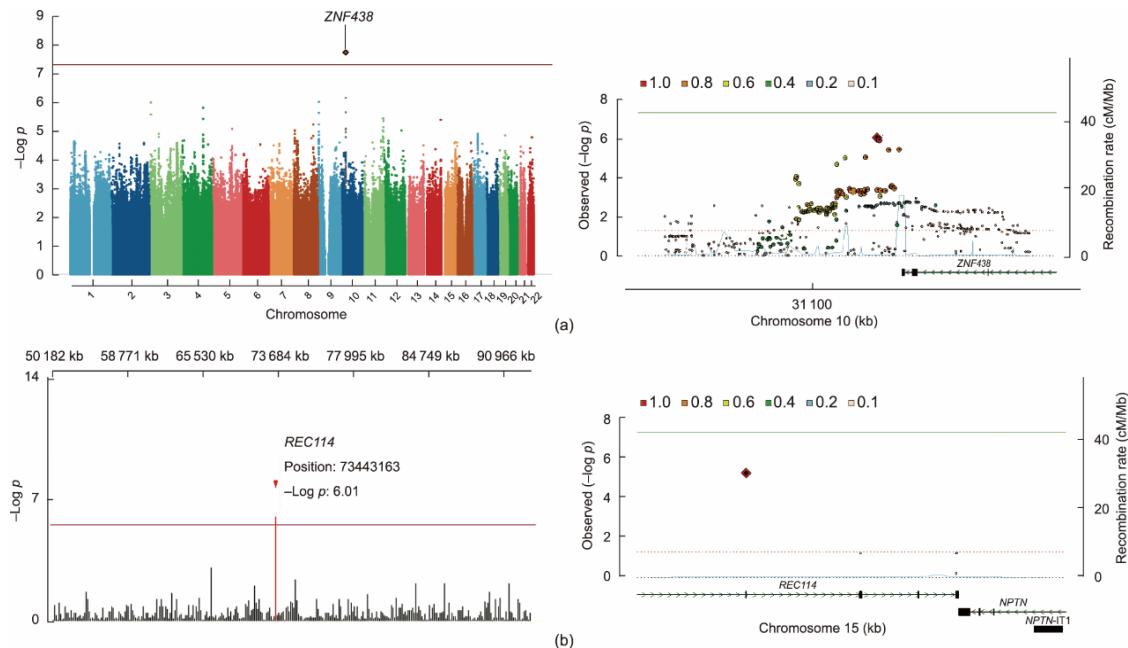


图 1. 进行促排卵治疗的多囊卵巢综合征患者与排卵显著相关的 SNP。(a) 常见突变 *ZNF438* rs2994652 的总体曼哈顿图 (左) 和位点区域 (右, 10p11.23)。(b) 罕见突变 *REC114* rs182542888 的总体曼哈顿图 (左, 染色体 15: 50~100 Mb) 和位点区域 (右, 15q24.1)。这两种变异都与排卵显著相关。在曼哈顿图中, 变异用基因名称表示。对于位点区域, 连锁不平衡值是通过来自 Trans-Omics for Precision Medicine (TOPMed) 填补后合并意大利和西班牙数据集所得到的基因类型进行计算获得。以 hg19 为参考绘制基因组的位置。重组率以厘米 (cm)/百万碱基对 (Mb) 表示。图中点显示基因的名称和位置; 转录链用箭头表示。基因由内含子和外显子区域代表。每一组中的红色菱形区域代表与相应结局最相关的突变。NPTN: 神经降解素基因; IT1: 内含子转录本 1。附录 A 中的图 S3 提供了详细的分位数-分位数 (QQ) 图和功能突变。表 S2 和表 S3 为详细的突变信息。

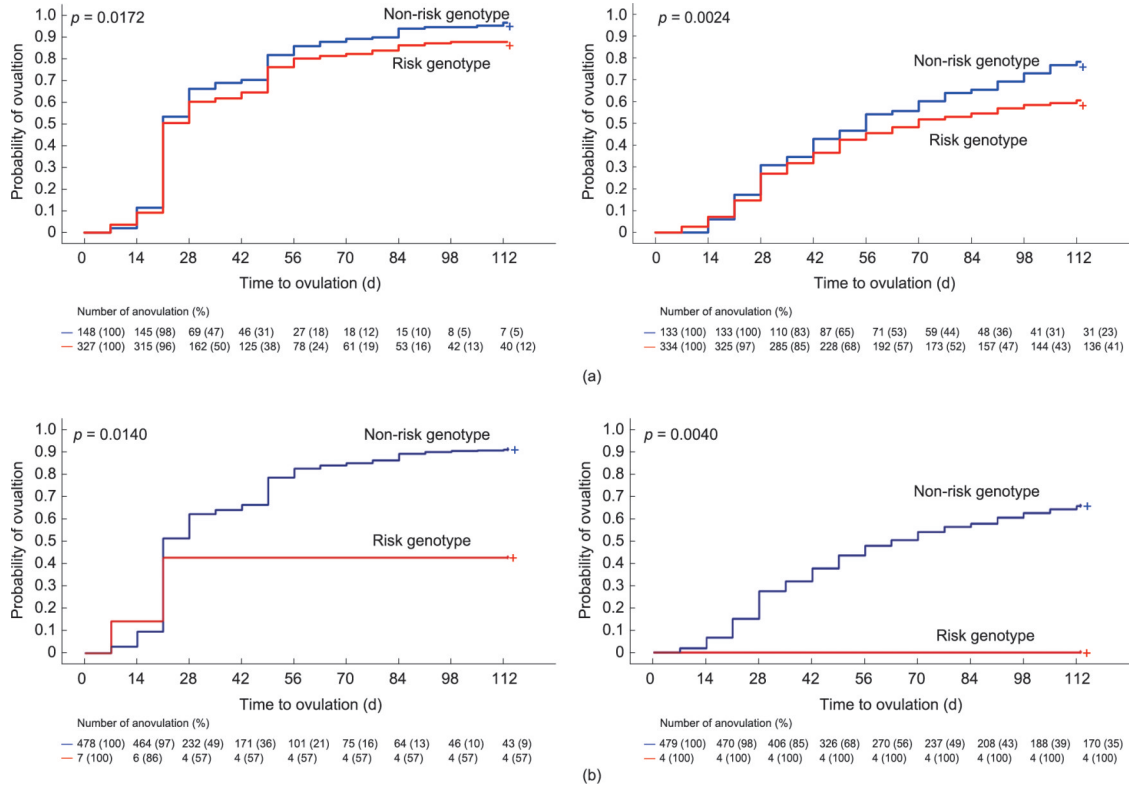


图2. 突变与排卵时间的Kaplan-Meier曲线。克罗米芬(左)或安慰剂(右)治疗后,不同突变导致的风险基因型(红色)与无风险基因型(蓝色)的排卵概率。与非风险基因型者相比,携带*ZNF438* rs2994652 (a)和*REC114* rs182542888 (b)突变的女性在克罗米芬组(均值分别为42.0天vs.36.1天和71.6天vs.39.5天)和安慰剂组(均值分别为71.1天vs.63.5天和113.0天vs.68.9天)均表现出排卵时间显著延长。

女性中,白三烯、前列腺素和氢过氧化物等分别与LH ($r = -0.761, p = 0.011$)、TT ($r = -0.709, p = 0.022$)和AMH ($r = -0.507, p = 0.013$)水平呈负相关。

3.5. 机器学习创建预测模型

筛选的临床特征被纳入机器学习算法用以预测排卵(附录A中的图S12)。嵌合风险基因型及其相关代谢物的逻辑回归模型比只纳入风险基因型或其相关代谢物的回归模型表现更好(图4),外部验证的AUC为0.77,PPV为0.84,Kappa系数为0.29(附录A中的表S6)。预测模型中的重要特征包括治疗措施、AMH、rs2994652、每年月经周期数、BMI、rs182542888、黑棘皮症评分、吸烟、改良Ferriman-Gallwey (FG)评分、氢过氧化物和月经周期天数。这些特征与机器学习算法中的其他模型结果一致(附录A中的图S12)。

4. 讨论

*ZNF438*的一个常见变异位点rs2994652和*REC114*的一个罕见变异rs182542888被发现与PCOS女性诱导排卵后的无排卵应答在全基因组水平上显著相关。携带这两个

基因变异/突变的PCOS女性接受克罗米芬治疗的无排卵风险增加和平均首次排卵时间延长。此外,携带*ZNF438*变异的PCOS女性的L-苯丙氨酸显著升高,并与HOMA-IR和空腹胰岛素呈正相关,而携带*REC114*变异者的花生四烯酸水平显著降低,并与TT、AMH和LH水平呈负相关。*REC114*和*ZNF438*变异参与PCOS中胰岛素抵抗和雄激素过多的临床表现,这些导致了不孕症治疗中的无排卵应答以及失败。

*ZNF438*基因位于10p11.2,其在健康成年女性的卵巢中呈高表达[16]。*ZNF438*蛋白属于Krüppel Cys2His2 (C2H2) 锌指蛋白(ZNF)家族,后者与代谢紊乱性疾病相关,包括肥胖症、高脂血症、心血管疾病[17]等。PCOS女性的外周血和滤泡液中均发现升高的苯丙氨酸[18-19],但在携带*ZNF438*变异PCOS女性中其水平显著升高,并与HOMA-IR指数呈正相关。苯丙氨酸/酪氨酸/色氨酸生物合成通路已被证实通过胰岛素受体底物磷酸化参与PCOS中的胰岛素信号传导缺陷过程。胰岛素抵抗被认为是PCOS的关键病理特征之一,不仅参与卵巢的无排卵,还参与系统性代谢疾病,如肥胖症、高脂血症、代谢综合征和非酒精性脂肪肝病等[20]。除更高的*ZNF438*变异频率,我们发现接受克罗米芬治疗的PCOS女性中,无

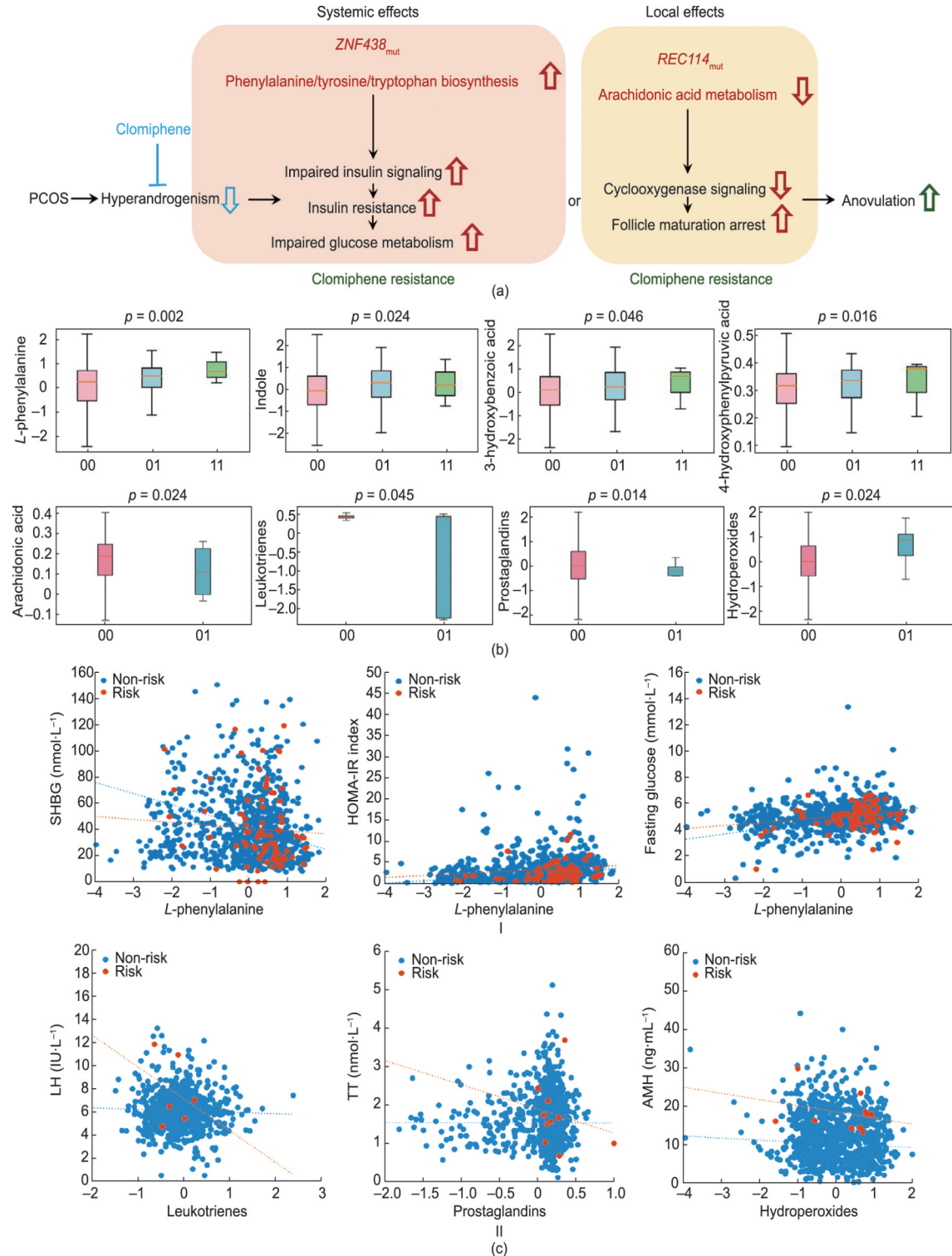


图 3. 在多囊卵巢综合征中 *ZNF438* 和 *REC114* 突变的代谢影响。(a) *ZNF438* 和 *REC114* 风险突变 (*ZNF438_{mut}* 和 *REC114_{mut}*) 与多囊卵巢综合征的克罗米芬抵抗机制和整体排卵效应。(b) 代谢组学筛选出与 *ZNF438_{mut}* 和 *REC114_{mut}* [00: 野生型 (粉色); 01: 杂合子 (蓝色); 11: 纯合子 (绿色)] 相关的重要代谢物定量水平 (归一化对数转换浓度), 分别为苯丙氨酸/酪氨酸/色氨酸生物合成途径 (L-苯丙氨酸) 及花生四烯酸代谢 (花生四烯酸)。箱线图显示的是中位数、四分位数 (第一和第三) 以及第 5 和第 95 个百分点; p 值来自混合线性模型。代谢组学特征和重要代谢途径详见附录 A 中的图 S8 至图 S12。(c) I: *ZNF438* 风险基因型 (橙色) 和无风险基因型 (蓝色) 中 L-苯丙氨酸浓度 (归一化对数变换浓度) 与 SHBG、血糖水平以及胰岛素抵抗稳态模型评估 (HOMA-IR) 指数的相关性 (SHBG: 无风险型, $r = -0.088, p = 0.012$; 风险型, $r = -0.268, p = 0.015$ 。血糖: 无风险型, $r = 0.246, p = 0$; 风险型, $r = 0.326, p = 0.003$ 。HOMA-IR: 无风险型, $r = 0.128, p = 0$; 风险型, $r = 0.219, p = 0.049$)。II: *REC114* 风险基因 (橙色) 和无风险 (蓝色) 基因型中白三烯、前列腺素和过氧化氢浓度 (归一化对数转换浓度) 分别与 LH、TT 和 AMH 的相关性 (白三烯: 无风险型, $r = -0.082, p = 0.014$; 风险型, $r = -0.761, p = 0.011$ 。前列腺素: 无风险型, $r = -0.033, p = 0.325$; 风险型, $r = -0.709, p = 0.022$ 。过氧化氢: 无风险型, $r = -0.076, p = 0.022$; 风险型, $r = -0.507, p = 0.013$)。 r 表示 Spearman 等级相关系数; p 值来自混合线性模型。

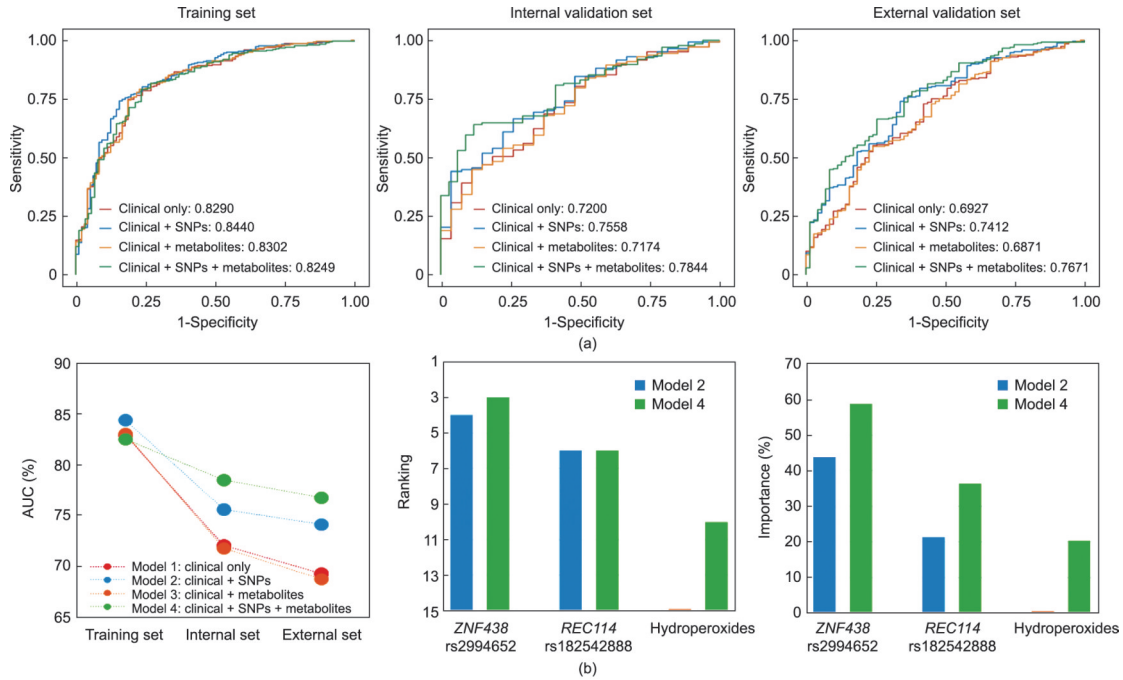


图4. 排卵预测。(a) 预测多囊卵巢综合征患者治疗后排卵的不同测试数据集。结合临床特征、显著风险基因型 (SNPs、*ZNF438* rs2994652 和 *REC114* rs182542888) 构成的遗传因素、相关代谢产物 (L-苯丙氨酸、花生四烯酸、白三烯、前列腺素和过氧化氢) 组成的代谢特征, 使用逻辑回归算法区分排卵和无排卵所获得的 AUC 范围从 0.6927 (95% 可信区间, 0.676~0.7955) 到 0.7671 (95% 可信区间, 0.7059~0.8283)。(b) 不同模型的比较, 包括 AUCs、排序和筛选特征的重要性 [风险基因型 (*ZNF438* rs2994652 和 *REC114* rs182542888) 和代谢特征 (过氧化氢)]。就 AUC、排序和筛选特征的重要性方面而言, 风险基因型和代谢特征组合模型增加了预测效能。该模型与其他深度学习机器学习算法构建的排卵预测模型的比较见图 S12, 每个模型的具体参数值见表 S6。

排卵者也有着更高的腰围、收缩压、甘油三酯水平和空腹胰岛素水平, 这些都是代谢综合征的主要参数。因此, 继发于 *ZNF438* 突变的卵巢和外周组织的胰岛素抵抗, 通过苯丙氨酸生物合成通路进一步导致排卵应答差和代谢紊乱。

REC114 基因位于 15p11.2, 为减数分裂 [21] 的 DNA 双链断裂形成过程所必需, 并在卵母细胞成熟和胚胎发育停滞中发挥作用 [22]。*REC114* 在许多细胞过程中发挥着启动子和增强子的作用, 如免疫反应、炎症和增殖等。在本研究中, 对于携带 *REC114* 突变的 PCOS 女性, 我们发现其前列腺素的水平下降并与 TT 呈负相关, 而氢过氧化物的水平增加并与 AMH 水平呈负相关。卵泡内升高的前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2) 介导了排卵的关键事件, 包括排卵过程中的卵丘扩大、卵泡破裂和卵子释放 [23]。*REC114* 变异可能与 LH 排卵峰后诱导的卵子减数分裂恢复失败有关, 而花生四烯酸水平降低可诱发卵泡成熟障碍 [24], 这些可能刺激窦卵泡的颗粒和卵泡膜层产生更多的 AMH 和睾酮。此外, 与健康对照组相比较, PCOS 女性的前列腺素水平如 PGE2 显著降低, 在暴露于雄激素后出现下降, 但胰岛素水平并无显著变化 [25]。因此, 有理由相信 *REC114* 突变通过花生四烯酸代谢通路不仅可能参与排卵失败, 并且加重卵巢雄激素状态。

目前, 在不孕症治疗前识别 (促排卵治疗) 无排卵应答的女性仍缺乏有效方法。各种临床的、内分泌的和卵巢超声影像学的特征都被尝试用作卵巢应答的预测因子。然而, 某些生物标志物如 FAI 并不能被准确测定, 这也限制了它们在临床的应用 [26]。此外, AMH 作为卵巢储备功能的标记物, 当血清水平大于 $7.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 其对排卵的预测能力也不佳, 而这种情况 ($\text{AMH} > 7.0 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 在 PCOS 女性中经常发生 [27]。最近, 在使用两个独立的 PCOS 队列进行的交叉验证的预测排卵研究中 [27-28], 发现 BMI、不孕症病程、胰岛素和血糖水平以及高雄激素血症被一致地筛选为预测因子。基于其灵活性、定量性和融合不同类型数据的优势 [29], 我们利用机器学习算法嵌入遗传和代谢因素构建了排卵预测模型。其次, 在纳入风险基因型和相关代谢物后模型的预测性能也得到改善。除治疗措施外, BMI、黑棘皮症评分、mF-G 评分、AMH、*ZNF438* 和 *REC114* 风险基因型被筛选为预测排卵的关键特征。AMH 和改良的 FG 评分 (一个高雄激素血症的指标) 与 *REC114* 突变相关, 而 BMI、黑棘皮症评分和收缩压与 *ZNF438* 突变介导的胰岛素抵抗相关。因此, *REC114* 和 *ZNF438* 突变及它们相关的临床特征为阐明中国汉族 PCOS 女性对促排卵治疗的应答提供思路。在临床实践中, 基因检测在精确医学背景下变得普通, 尤其是对于癌

症和一些退行性疾病。FSH受体 (Follicle-stimulating hormone receptor, FSHR) SNPs 已被尝试用作卵巢对促排卵治疗应答的预测因子, 尽管它应用于临床的潜力很小。基于我们的发现, 使用二代测序或聚合酶链反应 (PCR) 进行基因分型的靶标基因测序将是一种非常快速和廉价的检测[30], 这将为未来不孕症定制个性化治疗提供帮助。

在本研究中, 基于PCOS女性进行促排卵治疗的队列, 我们旨在找出对促排卵治疗应答的遗传因素。令人惊讶的是, 在全基因组水平的常见变异和罕见变异分析中, 新的风险基因 *ZNF438* 和 *REC114* 被发现, 而非PCOS的致病候选基因, 如 *FSHR* 等。鉴别出的风险基因型及其代谢物参与胰岛素信号和雄激素生物合成以及排卵过程, 并与克罗米芬治疗无关, 这些对其他促排卵治疗有着更广泛的意义。然而, 我们的研究仍有局限性。首先, 我们研究的样本量相对较小。然而, 它是基于一项随机临床试验的患者干预队列, 并使用全外显子组和靶向SNP进行测序, 这与PCOS个体和健康个体之间的病例对照遗传学研究不同。其次, 该研究结果可能只适用于中国汉族PCOS女性。更大样本的队列和不同的研究人群可能会识别出其他的相关变异和基于人群的变异, 并可进一步验证本文发现的结果。再次, 这种疾病的临床特征广和缺乏潜在的重要预测因子可能是预测性能改善微小的原因。此外, 这也意味着与临床特征相比, 遗传和代谢因子在预测临床结局方面的作用有限, 如 *FSHR* 多态性[31]。

5. 结论

综上所述, *ZNF438* 和 *REC114* 这两个新的基因突变及L-苯丙氨酸和花生四烯酸这两个新的代谢物, 参与了不孕症治疗失败过程。这些发现有助于更好地理解PCOS的发病机制, 并有助于制定个性化的PCOS女性不孕症治疗方案。

致谢

作者非常感谢PCOSAct小组的所有工作人员在收集当前研究中使用的血液样本和临床数据集方面所做出的努力。特别感谢来自德国德累斯顿生化研究所的Attila Toth教授提供了本研究的REC114抗体。本研究由国家重点研发计划(2019YFC1709500)、国家中西医结合危重病合作项目、黑龙江省创新团队“头雁”、刘以训和吴效科院士工作站、徐州市中西医结合生殖技术创新团队、黑龙江中医药大

学国家临床基地、黑龙江省卵巢疾病临床研究中心, 研究资助委员会[T13-602/21-N, C5045-20EF和14122021]以及中国香港食品和卫生局(06171026)资助。Ben Willem J. Mol得到国家卫生和医学研究委员会研究员资助(GNT1176437)的支持。Ben Willem J. Mol报告了参与ObsEva和Merck公司的咨询服务以及Merck公司提供了差旅支持。

作者贡献

吴效科、师咏勇和黄志超提出研究问题并设计研究。吴效科、师咏勇、曹义娟和黄志超设计分析方案。师咏勇和李志强负责全外显子组联合靶向SNP测序实验的设计和解释, 并对结果进行解释。高敬书、常惠、张多加、丛晶、王宇、吴奇、Xiaoxiao Han、Pui Wah Jacqueline Chung、Yiran Li和Lin Zeng负责代谢谱和免疫荧光染色实验及分析, 并对结果进行解释。Astrid Borchert和Hartmut Kuhn提供抗体和建议。郑煦和陈玲熙负责构建基于深度机器学习算法的预测模型。李建、吴奇、马红丽、郑煦和陈玲熙负责临床特征数据分析, 并对研究结果进行解释。李建、马红丽、常惠、丛晶和黄志超负责起草手稿。所有作者都对稿件进行了审核和修改。吴效科是本工作的负责人, 因此他对本研究中的所有数据保有全部访问权限, 并对数据的完整性和分析的准确性负责。

Compliance with ethics guidelines

Xiaoke Wu, Chi Chiu Wang, Yijuan Cao, Jian Li, Zhiqiang Li, Hongli Ma, Jingshu Gao, Hui Chang, Duojuan Zhang, Jing Cong, Yu Wang, Qi Wu, Xiaoxiao Han, Pui Wah Jacqueline Chung, Yiran Li, Xu Zheng, Lingxi Chen, Lin Zeng, Astrid Borchert, Hartmut Kuhn, Zijiang Chen, Ernest Hung Yu Ng, Elisabet Stener-Victorin, Heping Zhang, Richard S. Legro, Ben Willem J. Mol, and Yongyong Shi declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2022.08.013>.

References

- [1] Azziz R, Carmina E, Chen Z, Dunaif A, Laven JS, Legro RS, et al. Polycystic ovary syndrome. *Nat Rev Dis Primers* 2016;2(1):16057.
- [2] Balen AH, Morley LC, Misso M, Franks S, Legro RS, Wijeyaratne CN, et al. The management of anovulatory infertility in women with polycystic ovary syndrome: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance. *Hum Reprod Update* 2016;22(6):687–708.
- [3] Jones MR, Goodarzi MO. Genetic determinants of polycystic ovary syndrome: progress and future directions. *Fertil Steril* 2016;106(1):25–32.
- [4] Chen ZJ, Zhao H, He L, Shi Y, Qin Y, Shi Y, 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(1):55–9.
- [5] Shi Y, Zhao H, Shi Y, Cao Y, Yang D, Li Z, et al. Genome-wide association study identifies eight new risk loci for polycystic ovary syndrome. *Nat Genet* 2012;44(9):1020–5.
- [6] Zhang Y, Ho K, Keaton JM, Hartzel DN, Day F, Justice AE, et al. A genome-wide association study of polycystic ovary syndrome identified from electronic health records. *Am J Obstet Gynecol* 2020;223(4):559.e1–21.
- [7] Legro RS, Barnhart HX, Schlaff WD, Carr BR, Diamond MP, Carson SA, et al.; Cooperative Multicenter Reproductive Medicine Network. Clomiphene, metformin, or both for infertility in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 2007;356(6):551–66.
- [8] Legro RS, Brzyski RG, Diamond MP, Coutifaris C, Schlaff WD, Casson P, et al.; NICHD Reproductive Medicine Network. Letrozole versus clomiphene for infertility in the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med* 2014;371(2):119–29.
- [9] Wu XK, Stener-Victorin E, Kuang HY, Ma HL, Gao JS, Xie LZ, et al.; PCOSAct Study Group. Effect of acupuncture and clomiphene in Chinese women with polycystic ovary syndrome: a randomized clinical trial. *JAMA* 2017;317(24):2502–14.
- [10] Kuang H, Li Y, Wu X, Hou L, Wu T, Liu J, et al. Acupuncture and clomiphene citrate for live birth in polycystic ovary syndrome: study design of a randomized controlled trial. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013;2013:527303.
- [11] Loh PR, Danecek P, Palamara PF, Fuchsberger C, Reshef YA, Finucane HK, et al. Reference-based phasing using the haplotype reference consortium panel. *Nat Genet* 2016;48(11):1443–8.
- [12] Das S, Forer L, Schönherr S, Sidore C, Locke AE, Kwong A, et al. Next-generation genotype imputation service and methods. *Nat Genet* 2016;48(10):1284–7.
- [13] Auton A, Abecasis GR, Altshuler DM, Durbin RM, Abecasis GR, Bentley DR, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature* 2015;526(7571):68–74.
- [14] Price AL, Patterson NJ, Plenge RM, Weinblatt ME, Shadick NA, Reich D. Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nat Genet* 2006;38(8):904–9.
- [15] Zhan X, Hu Y, Li B, Abecasis GR, Liu DJ. RVTESTS: an efficient and comprehensive tool for rare variant association analysis using sequence data. *Bioinformatics* 2016;32(9):1423–6.
- [16] Zhong Z, Wan B, Qiu Y, Ni J, Tang W, Chen X, et al. Identification of a novel human zinc finger gene, ZNF438, with transcription inhibition activity. *J Biochem Mol Biol* 2007;40(4):517–24.
- [17] McConnell BB, Yang VW. Mammalian Krüppel-like factors in health and diseases. *Physiol Rev* 2010;90(4):1337–81.
- [18] Cree-Green M, Carreau AM, Rahat H, Garcia-Reyes Y, Bergman BC, Pyle L, et al. Amino acid and fatty acid metabolomic profile during fasting and hyperinsulinemia in girls with polycystic ovarian syndrome. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2019;316(5):E707–18.
- [19] Sun Z, Chang HM, Wang A, Song J, Zhang X, Guo J, et al. Identification of potential metabolic biomarkers of polycystic ovary syndrome in follicular fluid by SWATH mass spectrometry. *Reprod Biol Endocrinol* 2019;17(1):45.
- [20] Escobar-Morreale HF. Polycystic ovary syndrome: definition, aetiology, diagnosis and treatment. *Nat Rev Endocrinol* 2018;14(5):270–84.
- [21] Claeys Bouuaert C, Pu S, Wang J, Oger C, Daccache D, Xie W, et al. DNA-driven condensation assembles the meiotic DNA break machinery. *Nature* 2021;592(7852):144–9.
- [22] Wang W, Dong J, Chen B, Du J, Kuang Y, Sun X, et al. Homozygous mutations in REC114 cause female infertility characterised by multiple pronuclei formation and early embryonic arrest. *J Med Genet* 2020;57(3):187–94.
- [23] Duffy DM. Novel contraceptive targets to inhibit ovulation: the prostaglandin E2 pathway. *Hum Reprod Update* 2015;21(5):652–70.
- [24] Li S, Chu Q, Ma J, Sun Y, Tao T, Huang R, et al. Discovery of novel lipid profiles in PCOS: do insulin and androgen oppositely regulate bioactive lipid production? *J Clin Endocrinol Metab* 2017;102(3):810–21.
- [25] Zhang N, Wang L, Luo G, Tang X, Ma L, Zheng Y, et al. Arachidonic acid regulation of intracellular signaling pathways and target gene expression in bovine ovarian granulosa cells. *Anim Open Access J MDPI* 2019;9(6):374.
- [26] Fauser BCJM. Reproductive endocrinology: revisiting ovulation induction in PCOS. *Nat Rev Endocrinol* 2014;10(12):704–5.
- [27] Wu Q, Li J, Ng EHY, Liu JP, Legro RS. Do baseline AMH levels in women with polycystic ovary syndrome predict ovulation rate and time to ovulation: a secondary analysis of PCOSAct trial? *BJOG* 2021;128(9):1477–86.
- [28] Kuang H, Jin S, Hansen KR, Diamond MP, Coutifaris C, Casson P, et al. Identification and replication of prediction models for ovulation, pregnancy and live birth in infertile women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2015;30(9):2222–33.
- [29] Ngiam KY, Khor IW. Big data and machine learning algorithms for health-care delivery. *Lancet Oncol* 2019;20(5):e262–73.
- [30] Koriath CAM, Kenny J, Ryan NS, Rohrer JD, Schott JM, Houlden H, et al. Genetic testing in dementia—utility and clinical strategies. *Nat Rev Neurol* 2021;17(1):23–36.
- [31] Laven JSE. Follicle Stimulating Hormone Receptor (FSHR) Polymorphisms and Polycystic Ovary Syndrome (PCOS). *Front Endocrinol* 2019;2019(10):00023.