

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.10.003

类固醇生成因子-1 基因异常可导致 46,XY 严重睾丸发育不全

寸跃爽,朱 岷,郭淑娟,熊 丰

(重庆医科大学附属儿童医院内分泌科,重庆 400014)

【摘要】目的:在 46,XY 尿道下裂或隐睾病例中寻找类固醇生成因子-1(Steroidogenic factor-1, SF-1)基因异常情况,通过分析基因型与患儿表型的关系揭示 SF-1 基因在人类性腺分化发育中的作用机制。方法:收集 60 例 46,XY 尿道下裂或隐睾且肾上腺功能正常的患者和 40 例外生殖器发育正常的男性儿童分别为病例组和正常对照组,对所有研究对象的 SF-1 基因进行测序,测序结果用标准核苷酸 BLAST 软件进行序列比对。结果:本研究发现了 1 例 SF-1 基因突变,为杂合子缺失 c.11835delC。该患儿的表型为尿道下裂会阴型伴双侧隐睾、生后呈女性外阴,严重的男性化不全。此外,还发现 1 个 SF-1 基因多态性位点 rs1110061(G/C),等位基因 G/C 的频率在病例组及正常对照组中分布无明显统计学差异。结论:SF-1 基因异常可能是 46,XY 尿道下裂或隐睾患儿的病因之一,其表型为 46,XY 严重男性化不全、严重睾丸发育异常。

【关键词】类固醇生成因子-1;尿道下裂;隐睾;单核苷酸多态性

【中国图书分类法分类号】R72

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-03-11

46,XY severe testicular dysgenetic induced by steroidogenic factor -1 gene deficiency

CUN Yueshuang, ZHU Min, GUO Shujuan, XIONG Feng

(Department of Endocrinology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To research the mutation of steroidogenic factor-1 (SF-1) gene from 46,XY hypospadias including cryptorchidism and to analyze the relationship between genotypes and phenotypes to reveal the action of SF-1 gene in human gonadal differentiation and development. Methods: Sixty 46,XY hypospadias including cryptorchidism subjects without adrenal insufficiency were enrolled as case group and 40 healthy male children with normal genital development were enrolled as normal control group. The SF-1 genes of all subjects were sequenced, then for DNA sequence alignment using standard nuclear BLAST. Results: A heterozygous deletion (c.11835delC) of SF-1 gene was detected. The patient was manifested with female genitalia at birth, perineal hypospadias with bilateral cryptorchidism and severe underandrogenization. One single nucleotide polymorphism (SNP) rs1110061 (G/C) of SF-1 gene was found. No significant statistical difference in the allele G/C frequency was found between case group and normal controls. Conclusion: SF-1 gene mutation may be one possible cause of 46,XY hypospadias including cryptorchidism, its phenotype is severe testicular dysgenesis including severe underandrogenization.

【Key words】steroidogenic factor-1; hypospadias; cryptorchidism; single nucleotide polymorphism

人类性别和睾丸的分化发育是一个复杂的程序化过程,目前认为是多种涉及性腺分化的基因及转录因子正常表达的结果。其中重要的因子包括 Y 染色体上性别决定因子 (Sex-determining region of the Y chromosome, SRY)、类固醇生成因子-1 (Steroidogenic factor-1, SF-1)、抗苗勒氏管因子 (Anti-Müllerian hormone, AMH) 等。睾丸分化发育的具体调控机制尚不完全清楚,而 SF-1 基因异常可能是睾丸

发育不全的原因之一。SF-1 是一种细胞核受体,是由 461 个氨基酸组成的蛋白质,在人类胚胎第 6 周开始就持续表达于从尿生殖嵴至睾丸分化、发育成熟的整个过程中^[1]。SF-1 能调节许多涉及性腺分化发育、类固醇生成及生殖的多种基因的表达^[2]。体外实验发现 SF-1 基因敲除小鼠表现为性腺及肾上腺发育异常^[2]。近十几年,国际上已发现的 SF-1 基因异常的病例并不多见 (30 多例),多数表现为 46,XY 性腺发育不全 (外生殖器严重男性化不全、睾丸发育严重异常) 且肾上腺功能正常^[3]。且 SF-1 在人类性腺发育中的具体作用及机制尚不清楚,本研究从 46,XY 尿道下裂或隐睾病例中寻找 SF-1 基因异

作者介绍:寸跃爽 (1985-),女,硕士,

研究方向:类固醇生成因子-1 与 46,XY 性腺发育异常。

通信作者:朱 岷,女,教授,Email: zhumin323@hotmail.com。

基金项目:重庆市科委自然科学基金资助项目 (编号:CSTC2007BB5313)。

常,分析基因型与患儿临床表型的关系进一步揭示 SF-1 在人类性腺分化发育过程中的具体作用及机制。

1 对象与方法

1.1 标本收集与分组

于 2009 年 9 月至 2011 年 7 月于重庆医科大学附属儿童医院住院患者中收集 60 例 46,XY 不同程度的男性化不全及不同表型性腺发育不全而肾上腺功能正常的患者为病例组,筛选标准:(1)染色体核型为 46,XY,除外因染色体异常引起的性腺发育不全;(2)不同程度性腺发育不全患者,包括尿道下裂伴或不伴隐睾、单纯隐睾不伴尿道下裂;(3)肾上腺功能正常者,包括无肾上腺危象、电解质紊乱、低血糖等肾上腺不全的表现,且血清皮质醇(Cortisol,Cor)及促肾上腺皮质激素(Adrenocorticotrophic hormone,ACTH)的浓度均正常。病例组中尿道下裂患者 45 例,其中严重尿道下裂占 1/2(会阴型 9 例,阴囊型 15 例),尿道下裂伴隐睾 17 例(伴双侧隐睾 7 例,伴单侧隐睾 10 例)(表 1);单纯隐睾不伴尿道下裂 15 例(双侧隐睾 12 例,单侧隐睾 3 例)。病例组患者平均年龄为(7.3±6.0)岁,平均出生体重为(2.46±0.57) kg,ACTH 平均值为(24.22±9.15) pg/ml。同时收集 40 例外生殖器发育正常男性儿童为正常对照组,纳入标准:(1)体检无尿道下裂、隐睾、小阴茎、小睾丸等性腺发育异常的男性儿童;(2)无肾上腺危象、低血糖、电解质紊乱等肾上腺功能不全的临床表现;(3)无器官功能衰竭、外伤等重大疾病。征得患儿与家长同意后,抽取所有研究对象的外周静脉血 2 ml。

表 1 病例组中尿道下裂患儿的例数统计					
Tab.1 Number of hypospadias cases in case group					
	尿道下裂				合计
	会阴型	阴囊型	阴茎根型	阴经体型	
伴双侧隐睾	3	2	2	0	7
伴单侧隐睾	1	5	3	1	10
不伴隐睾	5	8	14	1	28
合计	9	15	19	2	45

1.2 主要试剂及仪器

全血基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司);2×Power Taq Plus PCR MasterMix DNA 聚合酶(北京百泰克生物技术有限公司);DNA 测序仪(ABI3100Genetic Analyzer)。

1.3 方法

提取所有对象的全血基因组 DNA,对 SF-1 基因的 2~7 外显子进行 PCR 扩增。PCR 扩增的上下游引物如表 2 所示。选用 Bio Teke DNA 聚合酶,20 μl PCR 反应体系,PCR 反应条件,95 ℃变性,72 ℃延伸,扩增 27 个循环,PCR 产物纯化后直接测序,测序结果采用标准核苷酸 BLAST 软件与人 SF-1 基因序列(GenBank NG_008176.1)进行序列比对,结果有异常的反复测序 3 次,且采用 T-A 克隆法进一步证实。T-A 克隆法步骤:(1)将 PCR 产物与 T-载体连接;(2)转化至感受态细胞;(3)挑单克隆进行 DNA 测序。经序列比对后若明确是单核苷酸多态性(Single nucleotide polymorphism,SNP)位点,对病例组 and 对照组各 SNP 位点进行 Hardy-Weinberg 群体遗传平衡检验,取检验水准 α=0.05,若 P≥0.05 表明样本该位点的基因多态性符合 H-W 遗传平衡定律,则对该 SNP 位点进行分析。用 SPSS 16.0 对得到的数据进行统计分析。

2 结 果

本研究从病例组中发现 1 例杂合子缺失 c.11835delC (此缺失于 40 例正常对照中均未发现),此外于病例组及正常对照中均发现 SF-1 基因 SNP 位点 rs1110061(G/C),这 2 例 SF-1 基因异常均位于其第 4 外显子,SF-1 其余外显子均未发现异常,具体结果见以下叙述。

2.1 杂合子突变 c.11835delC 及先证者表型分析

本资料于 60 例不同程度 46,XY 男性化不患儿中发现 1 例 SF-1 基因突变 c.11835delC,该患儿表型为尿道下裂会阴型伴双侧隐睾。该突变位于 SF-1 铰链区,经 T-A 克隆鉴定(其中 1 条链该位点无 C 缺失,另 1 条链该位点缺失 1 个 C)为杂合子缺失 c.11835delC(图 1),即 SF-1 基因第 4 外显子上第 120 位碱基缺失 1 个 C,导致 SF-1 蛋白第 125 位氨基酸由脯氨酸(Proline,P/Pro)变成了精氨酸(Arginine,R/Arg)(CCG→CGA),该缺失可能造成框移突变,使氨基酸翻译提前终止于第 295 位氨基酸(p.P125RfsX170)。

先证者为 7 岁 4 月 46,XY 尿道下裂会阴型伴双侧隐睾术后的患儿。如表 3 示该患儿的 Cor 及 ACTH 水平正常,且生后无低血糖、电解质紊乱、休克、肾上腺危象等肾上腺功能不全的临床表现,说明其肾上腺功能正常。其 SRY 基因检测结果正常。此患儿生后外生殖器性别模糊,呈女性外阴,阴蒂约黄豆大小,后渐发育成阴茎形态,约 1.0 cm。1 岁长 1 月时 B 超于双侧腹股沟区探及睾丸样结构,盆腔可探及子宫及阴道。阴道子宫造影示膀胱后方有盲端阴道结构。行双侧性腺探查及睾丸固定术,活检为发育不良的睾丸组织。2 岁 11

表 2 SF-1 基因 2~7 外显子 PCR 扩增上下游引物序列		
Tab.2 PCR upstream and downstream primers of SF-1 gene 2~7 exons		
外显子	上游引物序列	下游引物序列
Exon2-3	5'-GCAGCGCTGGGCACAGA-3'	5'-TTGCCAGCGTCCCTTCG-3'
Exon 4	5'-GCGTCAGATTTGTTTGGA-3'	5'-GAGAGACACAGTAGGAAGAGAC-3'
Exon 5	5'-GTGGGAGGAGAAGGGGTGAGA-3'	5'-AAGGGCTGATAATTAGGGTG-3'
Exon 6	5'-CGGGTTGAGGAGAGCTCGGAAG-3'	5'-GCTCACAGCGGTATTCCCACT-3'
Exon 7	5'-GGTCATAGGAAGGTGCTATTGCTGAT-3'	5'-GCTCCTCGGTGGGCATCAGAAAA-3'

月,其外生殖器渐发育,阴茎短小,约 1.4 cm × 1.2 cm,重度下弯,背侧包皮堆积,腹侧包皮缺如,阴囊似大阴唇,左右两侧分离且双侧之间可见尿道开口,尿道开口下方可见阴道开口。4 岁 5 月时行双侧睾丸及阴茎切除术,术中见阴道为一盲端,现按女性抚养。

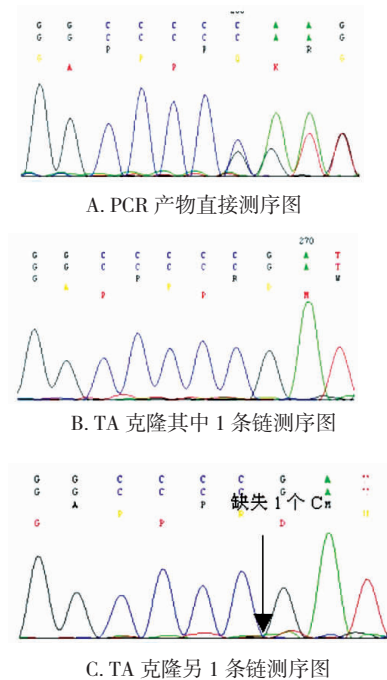


图 1 SF-1 基因杂合子缺失 c.11835delC 测序图

Fig.1 Sequence of SF-1 gene heterozygote deletion c.11835delC

表 3 先证者各年龄阶段卵泡刺激素、黄体生成素、睾酮、Cor 及 ACTH 的血清浓度

Tab.3 Serum concentrations of follicle-stimulating hormone, luteotropic hormone, testosterone, Cor and ACTH of prohand at different ages

年龄	卵泡刺激素 (mIU/ml)	黄体生成素 (mIU/ml)	睾酮 (ng/dl)	Cor (nmol/L)	ACTH (pg/ml)
1 岁 1 月	23.12	7.11	0.45	630	18
2 岁 11 月	7.30	0.15	10.30	420	25

参考范围:2.0~8.9 岁卵泡刺激素,0.20~0.85 mIU/ml; 黄体生成素:0.10~0.27 mIU/ml; 睾酮:0~20 ng/dl; Cor: 138~690 nmol/L; ACTH: 0~46 pg/ml

2.2 病例组及正常对照组 SNP 位点 rs1110061(G/C)

本研究于 60 例 46,XY 隐睾或尿道下裂且肾上腺功能

正常的病例及 40 例外生殖器发育正常的男性儿童中均发现了 SF-1 基因的 SNP 位点 rs1110061(G/C)。对病例组和正常对照组该 SNP 位点行 Hardy-Weinberg 群体遗传平衡检验,结果两组的 P 值均 >0.05 ,表明样本该位点的基因多态性符合 H-W 遗传平衡定律(表 4)。2 组之间相比较,各基因型(GG、GC、CC)及等位基因(G/C)的频率在 2 组间的分布均无明显统计学差异(P 值均 >0.05)(表 5)。

3 讨论

本研究从 60 例不同程度 46,XY 男性化不全的病例中发现 1 例 SF-1 杂合子缺失 c.11835delC,先证者的母亲及姐姐 SF-1 基因测序结果正常,父亲的 DNA 未获得。该缺失使 SF-1 蛋白从第 125 位氨基酸开始被替代,可能造成框移突变,使翻译提前终止于 295 位氨基酸(p.P125RfsX170)。如图 2 示:与野生型 SF-1 蛋白相比较,p.P125RfsX170 突变 SF-1 蛋白只有 DNA 结合区(DNA-binding domain, DBD)、A 盒组成,缺少 Hinge、配体结合区(Ligand binding domain, LBD)和 AF-2 转录活性区(Activation function 2, AF-2)。Correa 等^[4]人发现的位于 SF-1 基因第六外显子的杂合子 8 个碱基缺失,造成框移突变,使翻译提前终止于第 378 位氨基酸,产生的突变蛋白缺乏 LBD 及 AF-2 转录活性区(与本研究产生的突变蛋白相似),该突变蛋白的 DNA 结合能力及转录活性下降且有显性负作用。本研究虽尚未对 SF-1 基因 c.11835delC(p.P125RfsX170)行功能鉴定实验,基于以上所述,推测 p.P125RfsX170 突变 SF-1 蛋白的功能也应下降,但仍需行功能鉴定试验揭示该突变蛋白的功能变化,进一步了解 SF-1 在人类性腺分化发育过程中的具体作用机制。

SF-1 在人类胚胎第 6 周时表达于尿生殖嵴(尿生殖脊分化为具有双向潜能的性腺原基和肾上腺原基),能调节许多涉及性分化发育的基因,如 SRY、AMH(抑制苗勒氏管分化发育为子宫及阴道)等基因的表达^[2],在这些因子的作用下具有双向潜能的性腺向睾丸方向分化发育。睾酮在人类胚胎 7~8 周(性分化开始)时产生,能刺激男性生殖管道的生成,其转变为双氢睾酮能促进外生殖器的男性化。

表 4 病例组与正常对照组 SNP 位点的 Hardy-Weinberg 群体遗传平衡检验

Tab.4 Hardy-Weinberg population genetic equilibrium test of SNP in case group and normal control group

组别	实际例数				H-W 理论例数				$\alpha=0.05$	
	基因型			合计	基因型		合计		χ^2 值	P 值
	GG	GC	CC		GG	GC	CC			
病例组	26	24	10	60	24.067	27.867	8.067	120	1.156	0.282
正常对照组	20	14	6	40	18.225	17.225	4.225	80	1.637	0.201

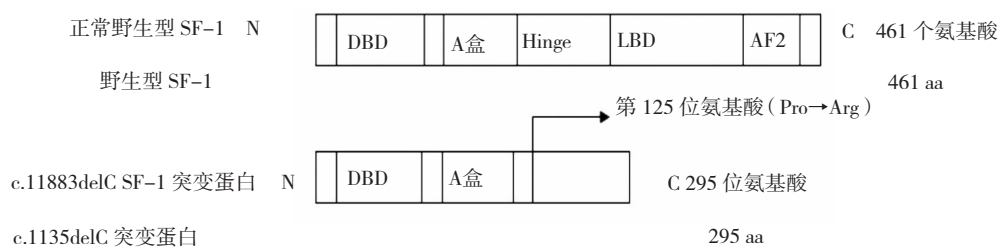


图 2 野生型 SF-1 蛋白与 c.11835delC SF-1 突变蛋白结构

Fig.2 Structure of wild type SF-1 and c.1135delC mutation protein

表 5 病例组和正常对照组 SF-1 基因多态性位点 rs1110061 (G/C) 等位基因 G/C 及各基因型 (GG/GC/CC) 的频率分布

Tab.5 Frequencies of allele G/C of SNP rs1110061 (G/C) and genotype (GG/GC/CC) between case group and normal control

		group		χ^2 值	P 值
		病例组	对照组		
基因型	GG	26 (43.3%)	20 (50.0%)	0.431	0.806
	GC	24 (40.0%)	14 (35.0%)		
	CC	10 (16.7%)	10 (15.0%)		
等位基因	G	76 (63.3%)	54 (67.5%)	0.366	0.545
	C	44 (36.7%)	26 (32.5%)		

本资料中先证者生后呈女性外阴,阴蒂约黄豆大小说明其阴茎严重发育不全。1岁1月时B超于双侧腹股沟探及睾丸样结构,病例活检其睾丸严重发育不全。B超可探及子宫及阴道,即其苗勒氏管结构尚未完全退化,表明此 SF-1 突变导致该患儿胎儿期睾酮及 AMH 表达量不足以使其生殖器完全男性化。以上资料说明 SF-1 很早就作用于睾丸的分化发育,该基因异常严重影响胎儿期睾丸的分化发育及睾酮、AMH 的产生。本研究从 60 例不同程度男性化不全及不同表型性腺发育异常(尿道下裂或隐睾)的病例中发现 1 例 SF-1 基因突变,该患儿的临床表型为尿道下裂会阴型伴双侧隐睾、生后呈女性外阴,外生殖器严重男性化不全,该研究中 SF-1 基因异常的概率较低。且迄今为止,已发现的 SF-1 基因突变患者并不多(30 多例),且多数患者的临床表型与该先证者相似^[3]。这说明 SF-1 基因异常可能是临床表型为 46,XY 严重男性化不全、严重睾丸发育异常但肾上腺功能正常患儿的病因之一,也扩大了诊断这类疾病的病因范围,但并不是较常见的原因。

本研究在 46,XY 尿道下裂或隐睾且肾上腺功能正常的病例及外生殖器发育正常的健康男性儿童中,均发现了 SF-1 基因 SNP 位点 rs1110061(G/C) (p.G146A),2 组之间相比,各基因型及等位基因 G/C 的频率分布差异均无统计学意义。陈有根等人对瑞典 368 例不同程度尿道下裂患儿及 760 例正常对

照的研究中发现该多态性位点等位基因 C 的分布频率在尿道下裂患者中上升($P<0.01$)^[5]。日本有研究发现等位基因 G/C 在隐睾症^[6]及严重的小阴茎^[7]患者中的分布频率也上升。但本研究的结果与之有异,即等位基因 G/C 的频率分布在隐睾或尿道下裂患者与正常对照之间的无明显统计学差异,说明多态性 p.G146A 和隐睾或尿道下裂疾病的关系有待进一步研究,但也不除外是本资料病例数及正常对照数相对较少或人群不同造成的差异。

总而言之,SF-1 很早就开始作用于人类性腺的分化发育,该基因异常可能是临床表型为 46,XY 严重男性化不全、严重睾丸发育异常患儿的病因之一,但并不是较常见的原因。

参 考 文 献

- [1] Val P, Lefrançois-Martinez A M, Veyssiere G, et al. SF-1 is a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues[J]. Nucl Recept, 2003, 1(1):8.
- [2] Lin L, Achermann J C. Steroidogenic factor-1 (SF-1, Ad4BP, NR5A1) and disorders of testis development[J]. Sex Dev, 2008, 2(4-5): 200-209.
- [3] Köhler B, Achermann J C. Update—steroidogenic factor 1 (SF-1, NR5A1)[J]. Minerva Endocrinol, 2010, 35(2):73-86.
- [4] Correa R V, Domenice S, Bingham N C, et al. A microdeletion in the ligand binding domain of steroidogenic factor 1 causing XY sex reversal without adrenal insufficiency[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(4):1767-1772.
- [5] 陈有根. MAMLD1、SF-1 基因和尿道下裂关系研究[D]. 济南: 山东大学, 2010.
- [6] Wada Y, Okzda M, Fukami M, et al. Association of cryptorchidism with Gly146Ala polymorphism in the gene for steroidogenic factor-1[J]. Fertil Steril, 2006, 85(3):787-790.
- [7] Wada Y, Okzda M, Hasegawa T, et al. Association of severe micropenis with Gly146Ala polymorphism in the gene for steroidogenic factor-1[J]. Endocr J, 2005, 52(4):445-448.

(责任编辑:唐秋姗)