

SRY 基因检测在儿童性发育疾病诊断中的应用

向萍霞 戴翔 冷培 刘翎 胡晞江

(武汉市妇女儿童医疗保健中心生殖医学实验室,湖北 武汉 430016)

[摘要] 目的 应用 SRY 基因直接测序检测技术和外周血染色体核型分析技术对外生殖器模糊的幼儿及青春期儿童进行检查以明确诊断。方法 采用常规 G 显带方法分析 20 例外生殖器模糊的患儿染色体核型,用 PCR 技术扩增其 SRY 基因,进行基因测序,分析是否存在 SRY 基因及 SRY 基因是否存在突变情况。结果 20 例患儿中 SRY 基因阳性的有 17 例,阴性 3 例。直接测序结果显示所有 SRY 基因阳性患者该基因均未发生突变。染色体核型分析中检出 4 例特殊核型为:46, XY, del(Y)(q12)/45, X, 46, XY, add(Y)(p11), 46, XY, r(9) 及 46, XY, 9qh+。结论 SRY 基因检测有助于明确儿童性发育疾病的分型,具有快速检测的优越性,与常规 G 显带相结合分析有助于儿童性发育疾病的初步诊断。 [中国当代儿科杂志, 2013, 15(7):555-558]

[关键词] SRY 基因;性发育疾病;儿童

SRY gene-testing in the diagnosis of disorders of sex development among children

XIANG Ping-Xia, DAI Xiang, LENG Pei, LIU Ling, HU Xi-Jiang. Department of Reproductive Medicine Laboratory, Wuhan Women and Children's Hospital, Wuhan 430016, China (Email: estheresther@sina.com)

Abstract: Objective To investigate the value of direct sequencing of sex-determining region Y (SRY) gene, as well as peripheral blood karyotype analysis, in the diagnosis of disorders of sex development (DSD) among children and adolescents with ambiguous genitalia. **Methods** The karyotypes of 20 children and adolescents with ambiguous genitalia were determined by conventional G-banding analysis. PCR amplification was used to detect SRY gene in these patients, and direct sequencing was used to judge whether there was SRY gene mutation. **Results** Of the 20 cases, 17 were positive for SRY gene, and 3 were negative for SRY gene. Direct sequencing revealed no SRY gene mutation in the positive cases, however karyotype analysis found 4 special karyotypes in these patients: 46, XY, del(Y)(q12)/45, X; 46, XY, add(Y)(p11); 46, XY, r(9); 46, XY, 9qh+. **Conclusions** SRY gene detection can help determine the type of DSD among children and has the advantage of quick detection. Used together with G-banding analysis, it is helpful for primary diagnosis of DSD among children. [Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(7):555-558]

Key words: SRY gene; Disorders of sex development; Child

小儿外生殖器模糊临床并不罕见,常伴有尿道下裂、单侧或双侧隐睾、阴蒂肥大、阴唇肿块等,曾诊断为两性畸形、性反转、雌雄间体等。2006年 Lawson Wilkins 儿科内分泌协会(Lawson Wilkins Paediatric Endocrine Society, LWPES)和欧洲儿科内分泌协会(European Society for Paediatric Endocrinology, ESPE)联合召开会议提出要以保护性术语“性发育疾病(disorders of sex development, DSD)”来给予诊断,并将 DSD 分为三类:性染色体异常的 DSD; 46, XY DSD 和 46, XX DSD^[1]。Y 染色体是含有基因最少的染色体, Y 短臂末端含有睾丸决定因子(testicular decisive factor, TDF), 1990 年 Sinclair 等^[2]报道 SRY (sex determining region of Y chromo-

some) 基因后, SRY 基因被认为是 Y 染色体上的男性性别决定基因,也就是男性分化的基因开关,它使性腺发育为睾丸而不是卵巢, SRY 基因定位于 Yp11.3, 为 TDF 的最近候选基因。由于近年来分子遗传学发展迅速,而常规细胞遗传学培养分析法具有耗时较长的缺点,因此有条件的实验室目前都增加了分子学方法以协助诊断。目前国内已有的报道,如唐艳平等^[3]使用 SRY 探针和 PCR 扩增技术对 8 例 18~32 岁的性发育异常的成人做了 SRY 基因分析,张晓珍等^[4]使用实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative fluorescence polymerase chain reaction, QF-PCR)对 30 例性发育异常小儿患者做了 SRY 基因分析,但他们的研究中均未明确提出性发

育疾病的概念,也未结合核型分析结果对其进行明确诊断。为研究 SRY 基因检测在儿童性发育疾病诊断中的应用,本研究对 20 例外生殖器模糊的幼儿及发育期儿童进行外周血淋巴细胞培养和染色体核型分析,并用 PCR 技术扩增 SRY 基因及进行直接测序序列分析,探讨 SRY 基因检测在儿童性发育疾病中的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2011 年 10 月至 2012 年 10 月我院收治的 20 例性发育疾病患儿为研究对象,年龄 2 d ~ 15 岁;临床诊断标准参照《实用小儿泌尿外科学》^[5],入选标准为:尿道下裂合并单侧或双侧隐睾、阴蒂肥大、阴唇肿块等,其中 1 例出生后 48 h 外阴性别含糊,双侧睾丸不能摸到,2 例青春期患儿因无月经来潮及第二性征发育差而就诊。见表 1。

1.2 染色体核型分析

常规在无菌条件下取患儿外周血 2 mL 进行淋巴细胞培养、制片,用 G 显带方法进行核型计数及分析,参照国际细胞遗传学命名体制 (ISCN2009) 法确定核型。

1.3 基因组 DNA 提取与 PCR 反应

应用 Genomic DNA Purification Kit 试剂盒 (Promega 公司) 从受检者外周血样本中提取基因组 DNA,经紫外分光光度计定量及纯度分析后,保存于 -20℃ 备用。扩增 SRY 基因外显子,上游引物:5'-TGAATA-CATTGTCAGGGTAC-3',下游引物:5'-TGTTGACA-CAACTTGTCTTG-3',片段长度 993 bp。引物由上海

生工公司合成。PCR 反应体系 (25 μL): 5 × Buffer 5 μL, dNTP 0.5 μL, Taq 酶 1.25 U, Mg²⁺ 2.5 μL, 引物 1 μL, DNA 200 ng, 加去离子水至 25 μL。PCR 反应在 ABI 公司 9700 型热循环仪上完成,产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测分析。

1.4 DNA 测序与数据分析

应用 Cycle-Pure Kit 纯化试剂盒 (OMEGA 公司) 对 PCR 产物进行纯化。应用 ABI 公司 3130 型基因分析仪进行正反向直接测序,引物与 PCR 引物相同。测序结果经 Sequencing Analysis 5.2 软件分析,并通过 GeneTool 与来自 NCBI 的 SRY 基因标准序列进行比对,确定是否存在突变位点。

1.5 病理切片及腹部 CT 检查

送检新鲜组织经 10% 福尔马林固定 > 24 h, 常规脱水、透明、浸蜡后包埋、切片,苏木精-伊红染色后镜下观察;应用 GE 公司 Optima CT660 仪进行腹部 CT 扫描 (平扫 + 增强) 检查。

2 结果

2.1 患儿核型分析与 SRY 基因检测结果

20 例患儿中 SRY 基因阳性有 17 例,阴性 3 例,且所有 SRY 基因阳性患儿该基因均未发生突变。常规 G 显带分析显示 13 例核型为 46, XY; 3 例核型为 46, XX; 其余 4 例为特殊核型患儿,染色体核型为嵌合型:46, XY, del (Y) (q12)/45, X, 46, XY, r (9)、46, XY, 9qh + 和 46, XY, add (Y) (p11)。共检测出 1 例真两性畸形, 19 例假两性畸形,结果见表 1。

表 1 患儿外周血染色体核型结果与 SRY 基因检测结果及分型

编号	例数	患儿年龄	性别	临床初步诊断/临床表现	SRY 基因检测结果	核型结果	分型
1	1	15 岁	女	外阴幼稚型,无月经来潮	+	46, XY	46, XY DSD
2~12	11	11 个月~15 岁	男	尿道下裂、单侧或双侧隐睾、阴茎下曲、小阴茎	+	46, XY	46, XY DSD
13	1	12 岁	女?	阴茎阴囊转位?	+	46, XY	46, XY DSD
14	1	9 岁	男	尿道下裂	+	46, XY, 9qh +	46, XY DSD
15	1	8 个月	女	阴蒂肥大	+	46, XY, r (9)	46, XY DSD
16	1	10 个月	男	隐匿阴茎、右斜疝	+	46, XY, add (Y) (p11)	46, XY DSD
17	1	1 岁	男	尿道下裂,左隐睾	+	46, XY, del (Y) (q12)/45, X	性染色体异常的 DSD
18~19	2	2 d~14 岁	女	阴蒂肥大/无月经来潮	-	46, XX	46, XX DSD
20	1	6 个月	男	尿道下裂并阴茎阴囊转位	-	46, XX	46, XX DSD

注: DSD 为性发育疾病

2.2 1 例真两性畸形患儿的腹部 CT 及病理检查结果

该例真两性畸形患儿编号为 1, 其腹部 CT 结果为: 盆腔内未见明显子宫影显示 (图 1)。患儿全麻

后行腹腔镜下双侧性腺切除术, 术中取被切除组织行病理检查, 结果可见生精小管样结构; 同时纤维组织被覆单层柱状上皮, 呈皱襞样生长, 符合“输卵管”结构, 见图 2。



图1 编号1患儿腹部CT结果 盆腔内未见明显子宫影显示。

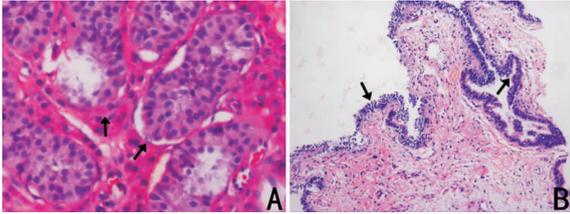


图2 编号1患儿手术取组织病理结果(苏木精-伊红染色, $\times 100$) A:送检的右侧性腺组织内可见生精小管样结构(箭头所示);B:送检的左侧性腺组织被覆单层柱状上皮,呈皱襞样生长,符合“输卵管”结构(箭头所示)。

3 讨论

人类的性腺发育是一个复杂连续的级联调控过程,涉及一系列复杂的多细胞间、多基因间的精确平衡和相互作用。DSD是先天性染色体异常、性腺发育异常、附属性器官解剖学异常的状态,ESPE/LWPES提出按照染色体的分类,将其分为性染色体异常的DSD;46,XY DSD和46,XX DSD等三大类^[6]。Y染色体上的SRY基因在性别发育中的重要作用已经被人们充分认识^[2,15-16],SRY基因转位、缺失或突变都会造成患儿生殖器模糊、性腺发育不良、性别逆转等^[7]。性发育疾病的发病率约为1/4500^[1],染色体核型分析和SRY基因检测对DSD患儿的诊断及发病机制探讨具有十分重要的意义。本研究检测20例患儿的外周血染色体核型及使用直接测序的方法分析患儿的SRY基因,未发现SRY基因突变。共检出16例46,XY DSD患儿、1例性染色体异常的DSD患儿和3例46,XX DSD患儿。46,XY DSD患儿中检测出一例真两性畸形,为卵睾性DSD,该患儿社会性别为女,因月经未来潮就诊,经检测外周血核型为46,XY,SRY阳性,手术后病理检查可见体内同时存在睾丸和卵巢两种性腺组织。现已提出SOX9(SRY related, HMG box)、WT1

(Wilms' tumor-1)等基因在男性性腺发育中也有重要作用^[8-9],是否这些基因突变影响SRY基因功能的表达有待进一步研究。由于患儿的年龄已经15岁,社会性别为女性,结合核型和SRY检测结果,手术中选择保留女性特征并切除容易恶变的卵睾组织。

例2~13这12例患儿的染色体均为46,XY,他们的SRY基因检测也是阳性,在DSD分类中可明确为46,XY DSD。患儿有外生殖器发育异常,表现为隐睾、尿道下裂及阴茎阴囊转位等,有可能是激素分泌水平异常、雄激素抵抗综合征、睾酮合成酶缺乏或其他基因突变等原因引起,SRY基因的目标基因如WDR5及可以影响SRY基因的表达与功能的SRY上游调节基因,都与睾丸发育及最终性别形成有关^[10-12]。完全雄激素不敏感综合征(complete androgen insensitivity syndrome, CAIS)在46,XY DSD中的发病率最高^[6]。例14和15这两例患儿SRY基因正常,染色体核型出现9号染色体的异常:例14核型为46,XY,9qh+,9号染色体长臂有异染色质的增加,目前认为有6%~8%的人类存在9号异染色质区的增加,这些区域含有未知的活动基因。此外,DNA限制性酶切分析表明在这些区域缺乏CpG岛,含高度重复DNA元件。重复序列的功能尚不完全清楚,可能与基因表达的调控,染色体的运动和染色体的稳定性有关^[13]。9号短臂末端9p24区域存在三个基因,DMRT-1,DMRT-2和DMRT-3,形成一个DM区(DNA-binding motif),与睾丸组织的表达有关,睾丸分化需要高DMRT-1表达,9p24区域的缺少会引起人类XY性反转^[14]。例15为46,XY,r(9)核型,环状9号染色体的断裂和重接发生于9p24和9q34,断裂点的远端缺失衍生为环状染色体,有可能造成DMRT-1基因的缺失。因此,虽然这两例患儿的SRY基因正常,但基因的表达与调控可能受到一定的影响而造成表型的异常。例16核型为46,XY,add(Y)(p11),是Y染色体短臂出现未知来源的增加,也无SRY基因丢失,但增加的部位有可能影响基因的表达及调控异常而发生睾丸发育不全。例17患儿染色体核型为46,XY,del(Y)(q12)/45,X的患儿,Y染色体出现断裂,但无SRY基因区域的丢失,由于结构异常的Y染色体在有丝分裂时容易发生排列错误和丢失,形成46,XY,del(Y)(q12)/45,X嵌合核型,临床表现为小阴茎、隐睾等。结合例2~17患儿的核型分析结果及SRY基因检测结果,对这16例患儿的性别确定及下一步治疗方案的选择可倾向于男性。

46, XX DSD 共检测到3例:例18~19核型分析结果为46, XX, SRY 基因检测阴性, 患儿临床表现为阴蒂肥大(例18患儿, 年龄2 d)或无月经来潮(例19患儿, 年龄14岁), 可能与患儿雄激素过剩、先天性肾上腺皮质增生有关, 目前已知先天性肾上腺皮质增生(congenital adrenal hyperplasia, CAH)是患儿外生殖器模糊的最常见原因, 占新生儿外生殖器模糊的50%^[6], 提示下一步激素检测的重要性。例20为46, XX 男性, 46, XX 男性是指无Y染色体但有睾丸发育的个体, 这类个体中SRY基因阳性的约占80%~90%, 患者外生殖器表现多正常。约有10%个体不含SRY基因, 患者外生殖器一般模糊不清^[15]。本研究中的这一例患儿SRY基因检测阴性, 外生殖器发育差, 男性性征不明显应与此有关。例18~19结合核型分析结果和SRY基因检测结果, 下一步的诊疗选择应倾向于女性。而例20因患儿年龄尚小, 可进一步做其他检测后再决定诊疗方向。

DSD包括胚胎及胎儿性决定和性发育异常。性别发育是由一系列基因控制的, 与46, XY DSD及46, XX DSD相关的基因明确的已经有WT1、SF1、SRY、SOX9及CYP19等^[16], 因而仅仅检测SRY基因是不够的, 对怀疑有DSD的婴幼儿及青少年, 国外文献推荐首先进行外周血或脐血培养以明确核型, 紧急情况则以荧光定量PCR(QF-PCR)或FISH(fluorescence in-situ hybridization)检测性染色体以判断是否存在嵌合体, 下一步的诊断推荐使用FISH/MLPA/array-CGH(array-based comparative genomic hybridization)技术检测微缺失或性染色体上基因的异常以明确诊断及分类: 性染色体异常的DSD、46, XY DSD和46, XX DSD以及这三大类下的各种细小分类^[17]。由于临床实验室在经费、方法学及质量控制方面存在一定的限制, 本研究中对20例患儿进行外周血染色体核型培养及分析, 同时使用直接测序的方法检测患儿的SRY基因, SRY基因检测提供的信息与常规染色体核型分析结合, 对于大致评估Y染色体的结构及功能状态可提供一定的帮助, 并对性发育疾病的明确诊断及下一步诊疗方向的确定起一定的促进作用, 而PCR直接测序的方法与常规细胞遗传学比较, 有检测快速的优势, 可在有条件的实验室推广应用。

[参 考 文 献]

- [1] Hughes IA, Nihoul-Fékété C, Thomas B, Cohen-Kettenis PT. Consequences of the ESPE/LWPES guidelines for diagnosis and treatment of disorders of sex development [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2007, 21 (3): 351-365.
- [2] Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif [J]. *Nature*, 1990, 346: 240-244.
- [3] 唐艳平, 王慧, 滕云, 杨真荣, 陈艳, 刘学飞, 等. 8例性发育异常患者SRY基因分析[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2005, 13 (1): 36-39, 41.
- [4] 张晓珍, 饶兆英, 周红平, 霍晓春, 钟立群. 30例性发育异常患者的SRY基因研究[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2006, 14 (6): 16-17.
- [5] 黄澄如. 实用小儿泌尿外科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 165, 372-373.
- [6] Hughes IA. Disorders of sex development: a new definition and classification [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2008, 22 (1): 119-134.
- [7] 任亮, 金杰, 山刚志, 那彦群, 郭应禄. 46, XX 男性性别逆转综合征(附一例报告) [J]. *中华泌尿外科杂志*, 2002, 23 (11): 673-675.
- [8] Chaboissier MC, Kobayashi A, Vidal VI, Lützendorf S, van de Kant HJ, Wegner M, et al. Functional analysis of Sox8 and Sox9 during sex determination in the mouse [J]. *Development*, 2004, 131 (9): 1891-1901.
- [9] Wang Y, Li Q, Xu J, Liu Q, Wang W, Lin Y, et al. Mutation analysis of five candidate genes in Chinese patients with hypospadias [J]. *Eur J Hum Genet*, 2004, 12: 706-712.
- [10] 欧阳海, 吴天鹏. 男性假两性畸形的病因学分析 [J]. *中华泌尿外科杂志*, 2008, 29 (8): 564-567.
- [11] Xu Z, Gao X, He Y, Ju J, Zhang M, Liu R, et al. Synergistic effect of SRY and its direct target, WDR5, on Sox9 expression [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (4): e34327.
- [12] Ross DGF, Bowles J, Koopman P, Lehnert S. New insights into SRY regulation through identification of 5' conserved sequences [J]. *BMC Mole Bio*, 2008, 9 (85): 1-15.
- [13] Bickmore W, Craig J (著); 房德兴, 齐名, 李法卿, 李素芹, 吴文智, 陈华标, 等(译). 染色体带: 基因组的图型 [M]. 北京: 科学出版社, 2000: 74-76.
- [14] Humphray SJ, Oliver K, Hunt AR, Plumb RW, Loveland JE, Howe KL, et al. DNA sequence and analysis of human chromosome 9 [J]. *Nature*, 2004, 429 (6990): 369-374.
- [15] Zenteno JC, López M, Vera C, Méndez JP, Kofman-Alfaro S. Two SRY-negative XX male brothers without genital ambiguity [J]. *Hum Genet*, 1997, 100 (5-6): 606-610.
- [16] Hughes IA, Houk C, Ahmed SF, Lee PA. Consensus statement on management of intersex disorders [J]. *Arch Dis Child*, 2006, 91: 554-562.
- [17] Ahmed SF, Achermann JC, Arlt W, Balen AH, Conway G, Edwards ZL, et al. UK guidance on the initial evaluation of an infant or an adolescent with a suspected disorder of sex development [J]. *Clin Endocrinol*, 2011, 75: 12-26.

(本文编辑: 万静)