

尿道下裂患儿染色体及核型分析



祖建成 雍 江 胡建军 刘 宇 赵天望 何 军

【摘要】 目的 通过对尿道下裂患儿染色体核型分析和 SRY 基因检测,初步明确染色体核型、SRY 基因缺失情况和尿道下裂之间的关系。 **方法** 采用染色体核型 Leica CytoVision® 自动细胞遗传学分析系统进行染色体核型分析。采用 PCR 扩增琼脂糖凝胶电泳方法对 SRY 基因进行检测。 **结果** 137 例尿道下裂患儿中,检测出染色体异常 10 例(7.29%),其中 I 型 2 例(2/46,4.3%),II 型 3 例(3/41,7.3%),III 型 2 例(2/26,7.6%),IV 型 3 例(3/24,12.5%),1 例患儿 SRY 检测阴性,染色体检测 45,XY,-21[10]/46,XY,r(21)[5]/46,XY,r(21;21)[13],行双侧睾丸活检,双侧活检均有睾丸组织和卵巢组织,为 DSD(disorders of sex development),其余病例未发现 SRY 异常。 **结论** 染色体和核型改变是尿道下裂形成的主要原因之一,已确定可引起尿道下裂的染色体畸变有十余种,对于外生殖器分化模糊,如伴尿道下裂、阴蒂肥大呈阴茎样,根据生殖器外观常难以正确决定性别的患者,通过性染色体检查有助于做出明确诊断,并根据染色体检查结果和临床其它检查,明确是否 DSD。

【关键词】 尿道下裂;染色体;核型分析

Chromosomal and karyotypic testing of hypospadias. Zu Jiancheng, Yong Jiang, Hu Jiangjun, Liu Yu, Zhao Yaowang, He Jun. Department of Urology, Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, China. Corresponding author: He Jun, Email: hjys840808@163.com

【Abstract】 Objective To preliminarily determine the relationship between chromosomal and karyotypic detection and hypospadias. **Methods** The chromosomes and karyotypes were detected by an automatic analyzer. **Results** Chromosomal detection of hypospadias was abnormal (10/137, 7.29%). And the clinical types were I (2/46, 4.3%), II (3/41, 7.3%), III (2/26, 7.6%) and IV (3/24, 12.5%). SRY detection was negative ($n=1$) with a genotype of 45, xy21/46, xyr(21)/46, xy, r(21;21), bilateral testicular biopsy revealed both testicular and ovarian tissues. The diagnosis was disorder of sex development. **Conclusion** Chromosome and karyotype changes may predispose to the formation of hypospadias. So far a dozen types chromosomal aberrations have been identified. For differentiating vague external genitalias, such as hypospadias and penis-like clitoral enlargement, gender is often difficult to determine. An examination of sex chromosomes helps to make a definite diagnosis. Based upon the results of chromosomal testing and clinical examinations, disorder of sex development is ascertained.

【Key words】 Hypospadias;Chromosomes;Karyotyping

男性外生殖器发育是一个复杂过程,始于 Y 染色体的遗传启动,同时与决定细胞分化、激素信号传导、酶活性、组织重塑所需的性别决定基因(sex-determining region on Y chromosome, SRY)及其蛋白产物-睾丸决定因子(testis determination factor, TDF)相关。染色体和核型改变是尿道下裂形成的原因,目前已确定可引起尿道下裂的染色体畸变有十余种,相关的染色体有 1、4、6、8、11、13、19、20、

21、X、Y 等十余条^[1]。对于外生殖器分化模糊,如尿道下裂,阴蒂肥大呈阴茎样,生殖器外观常难以正确决定性别的患者,通过性染色体的检查有助于做出 DSD 诊断。本研究通过对尿道下裂患儿进行染色体核型分析和 SRY 基因检测,明确染色体核型、SRY 基因缺失情况与尿道下裂之间的关系,并对是否 DSD 进行明确诊断。

材料与方法

一、研究对象

收集 2012 年 1 月至 2013 年 4 月本院收治的尿

道下裂患儿 137 人,年龄最大 13 岁,最小的 2.2 岁,平均年龄 4.6 岁。按黄澄如《实用小儿泌尿外科学》分型标准^[2]:Ⅰ型(阴茎头型、冠状沟型)46 例,Ⅱ型(阴茎型)41 例,Ⅲ型(阴茎根部和阴茎阴囊型)26 例,Ⅳ型(阴囊型、会阴型)24 例。

二、方法

1. 荧光原位杂交技术(fluorescence in situ hybridization, FISH):收集尿道下裂患儿新鲜血液标本,进行染色体核型检测:将 DNA 探针用特殊的核苷酸分子标记,然后将探针直接杂交到染色体或 DNA 纤维切片上,再用与荧光素分子耦联的单克隆抗体与探针分子特异性结合,检测 DNA 序列在染色体或 DNA 纤维切片上的定性、定位、相对定量分析,判断单个碱基突变^[3]。

2. SRY 检测:提取患儿 DNA,并将提取物经琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测为大于 50 kb 的人总 DNA,采用 PCR 技术对此进行 SRY 基因检测^[4]。

三、统计学处理

以 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计数资料用阳性例数或阳性率表示,尿道下裂各组之间的比较用 R×C 表 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

137 例尿道下裂患儿中,染色体异常 10 例(7.29%),其中 1 例患儿 SRY(-),染色体核型 45,XY,-21[10]/46,XY,r(21)[5]/46,XY,r(21;21)[13],睾丸活检提示为 DSD,其余均为 SRY(+),见表 1。染色体核型改变见于Ⅰ型 2 例(2/46,4.3%),Ⅱ型 3 例(3/41,7.3%),Ⅲ型 2 例(2/26,7.6%),Ⅳ型 3 例(3/24,12.5%),见表 2。

表 1 尿道下裂染色体核型改变情况

Table 1 Chromosomal and karyotypic changes of hypospadias		
编号	染色体异常	SRY
1	46,xy,1qh+	SRY(+)
2	46,xy,16qh+	SRY(+)
3	46,xy,15p+	SRY(+)
4	46,xy,14p+	SRY(+)
5	45,xy-21/46,xyr(21)/46,xy,r(21;21)	SRY(-)
6	46,xy,yp+,46,xyinv(3)	SRY(+)
7	46,xy,(q21q25),9qh+	SRY(+)
8	47xy+21	SRY(+)
9	46xy 大 y	SRY(+)
10	46xy 小 y	SRY(+)

表 2 不同类型尿道下裂染色体核型改变情况(n)

Table 2 Chromosomal and karyotypic changes in different types of hypospadias(n)		
分型	染色体核型改变	SRY(-)
Ⅰ型(n=46)	2	0
Ⅱ型(n=41)	3	0
Ⅲ型(n=26)	2	0
Ⅳ型(n=24)	3	1

讨 论

种族繁衍延续的物质基础是性别决定和分化。生物体内染色体(主要是性染色体)的完整性决定性别,染色体畸变和尿道下裂存在一定的相关性^[1]。我们的研究表明尿道下裂患儿染色体畸变发生率不高。夏爱丽等^[5]研究表明:大 Y 染色体核型可引起尿道下裂,Y 染色体微结构变化对生育有影响。沈婉英^[6]报告大 Y 染色体在人群中占 13.81%。现知 Y 染色体长臂(Yq)远端的 2/3 为结构异色质,是 Y 染色体发生长度变化的最常见部位。但长度变化的病因尚未清楚,有人认为与易位、缺失、复制等有关,也有人认为是染色质中 DNA 重复过度所致。随着辅助生殖技术迅速发展和荧光原位杂交技术等新技术的应用,染色体的诊断水平提高,异常检出率随之增加^[7,8]。我们的研究发现,尿道下裂患儿染色体核型改变中存在大 Y 的改变,其突变频率并不很高(1/137),说明大 Y 染色体可能是尿道下裂发病的风险因素。

性器官发育过程还需要有基因和激素的共同作用,最终决定或形成睾丸(雄性)或卵巢(雌性)。哺乳动物性别决定中 SRY 起关键作用,Yp11.3 是 SRY 定位点,其存在一个外显子,无内含子,编码一种 DNA 结合蛋白,以转录因子形式存在于睾丸 Sertoli 细胞核中。该蛋白被分为 3 个区域,其中间的约 80 个氨基酸残基称为 HMG box (highmobility group box, HMG box),是主要的功能域。HMG box 能特异性识别并结合核心序列 AACAAAG,并能使之结合的 DNA 弯曲成某一角度。当编码 HMG box 基因发生突变时,SRY 蛋白结合 DNA 的活性将会改变。蛋白 N 端的丝氨酸残基磷酸化后可增强与 DNA 结合活性,HMG box 两端还携带有两个独立的核定位信号^[9]。SRY 蛋白产物睾丸决定因子(TDF),启动睾丸分化,抑制睾丸发育负调节,SRY 突变将导致 XY 性逆转等性别异常的形成和

发育^[10]。

Harley VR 等^[11]研究报道 4 例 XY 女性反转病人,发现 SRY 的信号位点处均发生了错义突变。研究表明突变的 SRY 蛋白仅有部分定位在胞质,而野生型蛋白则限制在核内。每个信号都独立引导一种载体蛋白进行核运输,任何一个发生突变都会影响核内浓集的程度和效率。人类性腺嵴形成于受精后 33 d 左右,第 41 天 SRY 能在 XY 胚胎中检测,第 44 天高峰时可辨认睾丸索。第 52 天 Sertoli 细胞包围生殖细胞,并在 Sertoli 细胞核中持续低水平表达 SRY^[12]。这与其在性腺分化早期睾丸决定因子的作用相一致,SRY 突变与性反转患者有关。DNA 序列分析显示大多数 XX 男性反转患者中存在 SRY,而仅有大约 15% 的 XY 女性患者中发现 SRY 的点突变或缺失。这一结论支持 SRY 是睾丸决定因子,同时也表明除 SRY 外还存在其他的性别决定基因的突变^[12]。几乎所有携带 SRY 突变的 XY 女性患者均有完全性腺发育不良,这与 SRY 在睾丸形成早期起关键作用相一致,这些患者的外生殖器和正常女性一样,由于完全的性腺发育不良和卵巢功能丧失,临床上表现为原发性闭经,50% 的病例伴发性腺肿瘤(性腺胚胎细胞瘤和无性细胞瘤),手术中需常规切除性腺^[13]。SRY 的突变大多是新生突变,错义突变则集中于基因的中心区,即编码 HMG box 的序列。这强烈支持 DNA 结合基序的重要作用。但并不是所有 SRY 突变都导致完全的性反转。Jordan 和 Brian K 等^[14]在 1 例家族性 SRY 突变的病例中,发现 XY 女性反转患者父亲也携带相同 SRY 突变,但却有正常表型和生育能力,认为这可能与修饰基因的影响有关,患者与她父亲携带不同的修饰等位基因会导致不同的表型。本研究发现,尿道下裂患儿的 SRY 几乎阳性,仅 DSD 的患儿 SRY 出现阴性结果。我们推断,尿道下裂患儿在胚胎发育的起始期,作为性别启动的 SRY 并没有出现问题,尿道下裂患儿从一开始是按男性生殖器发育,尿道发育的障碍可能和 SRY 级联的下级基因突变相关,或者是多基因联合作用的结果。

染色体和其核型的改变是尿道下裂形成的原因,对于外生殖器分化模糊,我们需要通过性染色体及核型的检查以做出明确诊断,并结合临床其它检查,明确 DSD 诊断。

参考文献

- 1 夏家辉. 染色体病.《人类染色体病》[M], 北京:科学出版社,1987:189-268.
- 2 Xia JH. Chromosomal Diseases, Human Chromosomal Diseases[M], Beijing: Science Press, 1987, 189-268.
- 3 黄澄如. 小儿泌尿外科学 [M], 济南:山东科学技术出版社,1996:182.
- 4 Huang CR. Pediatric Urology [M], Jinan: Shandong Science and Technology Press, 1996:182.
- 5 Ratan ZA, Zaman SB, Mehta V, et al. Application of Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) Technique for the Detection of Genetic Aberration in Medical Science Cureus [J]. 2017, 9(6): e1325. DOI: 10. 7759/ cureus. 1325.
- 6 De Sousa SM, Kassahn KS, McIntyre LC, et al. Case report of whole genome sequencing in the XY female: identification of a novel SRY mutation and revision of a misdiagnosis of androgen insensitivity syndrome [J]. BMC Endocr Disord, 2016, 16(1): 58. DOI: 10. 1186/s12902-016-0141-7
- 7 夏爱丽, 周惠耕, 周黎明, 等. 95 例大 Y 染色体核型的临床效应分析 [J]. 浙江临床医学, 2008, 4(04): 440-441. DOI: 10. 3969/j. issn. 1008-7664. 2008. 04. 005.
- 8 Xia AL, Zhou HG, Zhou LM, et al. Clinical effect analysis of 95 cases of large Y chromosome karyotype [J]. Zhejiang J Clin Med, 2008, 4(04): 440-441. DOI: 10. 3969/j. issn. 1008-7664. 2008. 04. 005.
- 9 沈婉英. 汉族男性 Y 染色体相对长度 152 例分析 [J]. 遗传与疾病, 1990, 7(1): 37-38.
- 10 Shen WY. Analysis of the relative length of male Y chromosome in han nationality (152 cases) [J]. Genetics and Diseases, 1990, 7(1): 37-38.
- 11 Halliday J, Oke K, Breheny S, et al. Beckwith-Weidemann syndrome and IVF: a case-control study [J]. Am J Hum Genet, 2004, 75(3): 526-528.
- 12 Arnold AP. A General Theory of Sexual Differentiation [J]. J Neurosci Res, 2017, 95(1-2): 291-300. DOI: 10. 1002/jnr. 23884.
- 9 Carmichael SL, Ma C, Choudhry S, et al. Hypospadias and genes related to genital tubercle and early urethral development [J]. J Urol, 2013, 190(5): 1884-1892. DOI: 10. 1016/j. juro. 2013. 05. 061.
- 10 Tanaka SS, Nishinakamura R. Regulation of male sex determination: genital ridge formation and Sry activation in mice [J]. Cell Mol Life Sci, 2014, 71(24): 4781-4802. DOI: 10. 1007/s00018-014-1703-3.
- 11 Harley VR, Layfield S, Mitchell CL, et al. Defective import in β recognition and nuclear import of the sex-determining factor SRY are associated with XY sex-reversing mutations [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(12): 7045-7050. DOI: 10. 1073/pnas. 1137864100.
- 12 Munger SC, Natarajan A, Looger LL, et al. (下转第 587 页)
- 1 夏家辉. 染色体病.《人类染色体病》[M], 北京:科学出版社,1987:189-268.