

·专题· 儿童性别发育异常·

46,XY 性发育异常与单基因变异的相关性研究

吴鼎文¹ 吴德华² 郑静¹ 田红娟² 张婷¹
陶畅² 沈亚平¹ 陈光杰² 唐达星²

【摘要】目的 探讨46,XY性发育异常(disorders of sex development, DSD)的不同表型与单基因变异的关联性。**方法** 收集2018年2月至2018年11月间浙江大学医学院附属儿童医院137例临床诊断为46,XY DSD的病例,并提取外周血基因组DNA。采用液相捕获技术靶向捕获2742个疾病基因,通过高通量测序和生物信息学方法获取基因编码区和临近10 bp区域的变异,参考ACMG分类标准进行分级。将测试病例按临床表型分为“隐睾或小睾丸、尿道下裂、小阴茎或隐匿性阴茎、多种DSD表型、性别模糊、综合征型DSD”六组。计算不同表型与基因变异对46,XY DSD的阳性检出率、辅助诊断率。

结果 137例中有62例检出发现具备临床参考价值的变异,涉及SRD5A2、AR、NR5A1、AMH、FGFR1、PROKR2、DMRT1、MAMLD1、WT1、ZEB2、AKR1C2、CHD7、CYP17A1、DMRT2、FGD1、FRAS1、GATA4、MAP3K1、POR、SAMD9、TACR3、VANGL1、WNT5A共23个基因,综合阳性检出率为45.26%。62例中36例检出能解释临床表型的基因变异,涉及SRD5A2、AR、NR5A1、AMH、FGFR1、PROKR2、DMRT1、MAMLD1、WT1、ZEB2共10个基因,辅助诊断率为26.28%。隐睾或小睾丸、尿道下裂、小阴茎或隐匿性阴茎、多种DSD表型、性别模糊、综合征型DSD的阳性检出率分别为8.33%、26.32%、38.71%、57.14%、86.36%、66.67%,其辅助诊断率分别为0.00%、15.79%、16.13%、28.57%、63.64%、50.00%。**结论** 单基因变异是46,XY DSD的重要遗传学病因之一,基因变异的阳性检出率和辅助诊断率均与临床表型的多样性及严重程度呈正相关;靶向捕获疾病基因联合高通量测序可作为“性别模糊、综合征型DSD、多种DSD表型”46,XY DSD遗传学测试的首选方法。

【关键词】 性腺发育不全,46,XY/胚胎;基因/遗传学

【中图分类号】 R726.9 R691.1 R393

Correlations between phenotype and monogenic mutation of 46,XY sexual development disorder. Wu Dingwen¹, Wu Dehua², Zheng Jing¹, Tian Hongjuan², Zhang Ting¹, Tao Chang², Shen Yaping¹, Chen Guangjie², Tang Daxing². 1. Department of Genetics & Metabolism, Affiliated Children's Hospital, Zhejiang University School of Medicine; Key Laboratory of Diagnosing & Treating Neonatal Diseases of Zhejiang Province, Hangzhou 310052, China; 2. Department of Urology, Affiliated Children's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310052, China.

【Abstract】Objective To explore the correlations between various phenotypes and monogenic mutations of 46,XY sexual development disorder (DSD) and provide valuable rationales for clinical application. **Methods** Genomic DNA was isolated from peripheral blood of 137 patients of 46,XY DSD. The exons of 2742 pathogenic genes were acquired by liquid phase capture technology. Variants on coding region and 10 bp around exon region of these genes were obtained by high throughput sequencing and bioinformatic analysis. And classification was performed according to the ACMG criteria. Furthermore, these patients were divided into 6 groups according to their clinical phenotypes, including cryptorchidism or small testicle, hypospadias, small penis or occult penis, multiple DSD phenotypes, hemaphroditism and DSD syndrome. Then the rate of positive findings and diagnostic

DOI:10.3969/j.issn.1671-6353.2019.03.006

基金项目:1. 国家重点研发计划(编号:2018YFC1002700); 2. 浙江省分析测试科技计划(编号:2018C3706); 3. 浙江省医药卫生科技计划(编号:2015KYA118)

作者单位:1. 浙江大学医学院附属儿童医院遗传与代谢科;浙江省新生儿疾病诊治重点实验室(浙江省杭州市,310052); 2. 浙江大学医学院附属儿童医院泌尿外科(浙江省杭州市,310052)

通讯作者:唐达星, Email: tangdx0206@zju.edu.cn

yield of different groups and associated gene mutations were analyzed. **Results** Positive/likely positive mutations with clinical value were identified in 62/137 patients involving 23 genes with an overall positive detection rate of 45.26% (*SRD5A2*, *AR*, *NR5A1*, *AMH*, *FGFR1*, *PROKR2*, *DMRT1*, *MAMLD1*, *WT1*, *ZEB2*, *AKR1C2*, *CHD7*, *CYP17A1*, *DMRT2*, *FGD1*, *FRAS1*, *GATA4*, *MAP3K1*, *POR*, *SAMD9*, *TACR3*, *VANGL1*, *WNT5A*). Furthermore, the diagnostic yield of characterized disease genes among patients with 46,XY DSD was 26.28% (36/137). Those with multiple DSD phenotypes, hermaphroditism and DSD syndrome had a higher rate of positive findings with the frequencies of 57.14%, 86.36% & 66.67% as well as diagnostic yield with the frequencies of 28.57%, 63.64% & 50.00% respectively than those with cryptorchidism or small testicle, hypospadias, small penis or occult penis. **Conclusion** Monogenic mutation is an important genetic cause of 46,XY DSD. The rate of positive findings and diagnostic yield are positively correlated with the severity of 46,XY DSD phenotype. Targeted capturing plus high-throughput sequencing may be used as the preferred method for genetic testing of hermaphroditism, syndromic DSD and multiple DSD phenotypes.

【Key words】 Gonadal Dysgenesis, 46,XY/Embryo; Genes/Genetics

性发育异常 (disorders of sex development, DSD) 是指由于染色体、性腺或性别解剖结构的异常发育而出现的一种先天性异常,其发生率为 0.1%~0.5%^[1,2]。根据染色体核型可将 DSD 分为性染色体 DSD、46,XX DSD 和 46,XY DSD^[3]。长期以来,临床上对于 46,XY DSD 的分型诊断主要依靠 HCG 刺激试验及内分泌激素测定结果,但仍有超过 50% 的病例无法被精确诊断^[4]。基因诊断是针对人类固有的遗传信息进行检测,能够找到疾病发生的本原,目前已成为各类遗传代谢病精准分型诊断的最有力依据^[5,6]。研究表明,46,XY DSD 的遗传背景复杂,涉及数十个基因,进行分子分型诊断的工作极具挑战性^[7]。关于 46,XY DSD 的基因检测,既往多采用 Sanger 测序进行单基因层面的研究。但 Sanger 测序技术无法满足同时对多个基因进行快速、准确、高效检测的要求,并且其通量的限制以及居高不下的测序成本极大地阻碍了检测效率的提高。而基于靶向基因捕获与高通量测序技术是针对感兴趣的特定基因外显子区域定制探针,并与基因组 DNA 进行杂交,经富集后利用高通量测序技术进行数据分析。由于测序的目标区域只占全基因组的一小部分,因此在保证获得足量目标基因变异信息的前提下极大地降低了测序成本。靶向基因捕获与高通量测序技术的组合应用既保留了信息自动化分析的优势,又避免检测过多冗余内含子区域,从而大大地提高了遗传缺陷疾病的检测效率^[8,9]。但遗憾的是在 46,XY DSD 基因检测领域,基于新一代基因测序技术 (NGS, next generation sequencing) 同时检测上百个基因的报道较少,不同表型 46,XY DSD 与单基因变异的相关性尚不明确。因此,该研究将着重探讨不同表型 46,XY DSD 与单

基因变异的相关性,以期为临床管理和决策提供参考依据。

材料与方法

一、研究材料

收集浙江大学医学院附属儿童医院 2018 年 2 月至 2018 年 11 月间 137 例临床诊断为 46,XY DSD 的病例,平均年龄 (50 ± 51) 个月;社会性别男 125 例,社会性别女 12 例。在知情同意原则下由患者法定监护人签署知情同意书,采集患者及其父母静脉血各 2.0 mL,EDTA 抗凝处理后于 4℃ 环境下保存备用。

二、研究方法

1. DNA 提取 采用 QIAamp DNA Blood Mini Kit,按照说明书提取全血基因组 DNA,采用 Invitrogen Qubit dsDNA 检测试剂盒与紫外分光光度计检测 DNA 浓度和纯度。

2. 建库及测序 采用安捷伦公司 SureSelect 临床医学外显子序列捕获试剂盒,通过多重探针杂交方法靶向富集目标区域序列;Agencourt AMPure XP 磁珠 (Beckman Coulter) 纯化捕获产物。按照 TruePrepTM DNA Library Prep Kit V2 for Illumina (Vazyme) 建库试剂盒操作说明书处理纯化产物,建库过程中对每个样本加上特殊标签 (True-PrepTM Index Kit V2 for Illumina, Vazyme)。文库经 Qubit 及 2100 Bioanalyzer (Agilent High Sensitivity DNA Kit, Agilent) 进行浓度及片段大小质检分析确定合格后,利用定量试剂盒 (Illumina DNA Standa ds and Primer Premix Kit, kapa) 进行文库精确定量并确定上机样本量,最后在 HiSeq 2500 (Illumina) 平台进行测序反应。测序数据总量大于 4G,目标区覆盖度大于

99.90%,目标区平均测序深度大于180次。

3. 数据处理 将高通量基因靶向测序数据 Fastq 进行低质量过滤,以人类基因组 hg19 为参考序列,通过 BWM、Picard 等生物信息软件进行序列比对与重复标记。采用 GATK、Samtools 进行变异位点的识别^[10]。采用 Annovar 注释软件将突变位点注释到公共突变数据库,根据突变位点在正常人群中的频率、序列保守性、突变引起的氨基酸改变以及在蛋白质结构中所处的位置进行结果分析,并通过 SIFT、Polyphen 及 MutationTaster 等 11 个生物信息软件预测突变对蛋白功能的影响程度^[11]。

4. 遗传来源检测 取 20 ng DNA,使用待测位点的特异性引物,按照 TaKaRa LA PCR™ Kit Ver. 2.1 操作流程进行 PCR 反应,并使用 NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up 切胶回收纯化。回收产物按照 BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit 操作流程进行测序 PCR 反应及纯化。纯化产物于 ABI 3500XL 平台进行测序。测序结果采用 SeqMan 软件进行序列比对分析。

5. DSD 基因变异的致病性判读 检索 HPO、OMIM、PubMed 等数据库,确定 SureSelect 临床医学外显子序列捕获试剂盒覆盖了 242 个 DSD 相关基因。参考 ACMG 分类标准对上述方法检出的可疑变异进行致病性评估,具体分为“致病的、可能致病的、意义未明的、可能良性的、良性的”5 个级别^[12]。其中评估级别为“致病的、可能致病的、意义未明的”的 DSD 相关基因的变异将被纳入本次研究。

6. 结果分析 将测试病例按临床表型分为“隐睾或小睾丸、尿道下裂、小阴茎或隐匿性阴茎”、多种 DSD 表型(表现为“隐睾或小睾丸、尿道下裂、小阴茎或隐匿性阴茎”中的 2 种以上表型)、性别模糊、综合征型 DSD(合并有非 DSD 的其它表型)共 6 组。对各病例组的阳性检出率(DSD 相关基因检出意义未明、可能致病、致病变异的病例数之和占患儿总人数比例)、辅助诊断率(DSD 相关基因检出可能致病与致病变异并符合遗传模式的病例数之和占患儿总人数比例)及基因变异与表型进行统计。辅助诊断率计算公式:(可能致病变异例数 + 致病变异例数)/总例数 × 100%。

结果

一、基因变异

137 例 46,XY DSD 中包括隐睾或小睾丸 13 例、

尿道下裂 38 例、小阴茎或隐匿性阴茎 31 例、多种 DSD 表型 27 例、性别模糊 22 例、综合征型 DSD 6 例。共检出 62 例具备临床参考价值的变异,涉及 23 个基因,详见表 1。62 例中 36 例检出具备辅助诊断价值的变异,涉及 10 个基因,详见表 2。

表 1 具备临床参考价值的基因变异检出情况(单位:例)

Table 1 Detection of gene mutations with clinical reference value (unit:case)

基因	隐睾或小睾丸	尿道下裂	小阴茎或隐匿性阴茎	多种 DSD 表型	性别模糊	综合征型 DSD	合计
SRD5A2	0	6	9	6	5	0	26
AR	0	1	0	0	3	0	4
NR5A1	0	0	0	1	3	0	4
AMH	0	0	0	0	3	0	3
FGFR1	0	0	1	1	0	0	2
PROKR2	0	0	0	1	0	0	1
DMRT1	0	1	0	0	0	0	1
MAMLD1	0	1	0	0	1	0	2
WT1	0	0	0	0	0	2	2
ZEB2	0	0	0	0	0	1	1
AKR1C2	0	0	0	0	1	0	1
CHD7	0	0	1	0	0	0	1
CYP17A1	0	0	0	1	0	0	1
DMRT2	0	0	0	0	1	0	1
FGD1	1	0	0	0	0	0	1
FRAS1	0	0	0	0	1	0	1
GATA4	0	0	0	2	0	0	2
MAP3K1	0	1	1	0	0	0	2
POR	0	0	0	2	0	0	2
SAMD9	0	0	0	0	1	0	1
TACR3	0	0	0	1	0	0	1
VANGL1	0	0	0	0	0	1	1
WNT5A	0	0	0	1	0	0	1
合计	1	10	12	16	19	4	62

表 2 具备辅助诊断价值的基因变异检出情况(单位:例)

Table 2 Detection of gene mutations with diagnostic value (unit:case)

基因	隐睾或小睾丸	尿道下裂	小阴茎或隐匿性阴茎	多种 DSD 表型	性别模糊	综合征型 DSD	合计
SRD5A2	0	3	4	5	5	0	17
AR	0	1	0	0	3	0	4
NR5A1	0	0	0	1	3	0	4
AMH	0	0	0	0	3	0	3
FGFR1	0	0	1	1	0	0	2
PROKR2	0	0	0	1	0	0	1
DMRT1	0	1	0	0	0	0	1
MAMLD1	0	1	0	0	0	0	1
WT1	0	0	0	0	0	2	2
ZEB2	0	0	0	0	0	1	1
合计	0	6	5	8	14	3	36

二、阳性检出率与辅助诊断率

隐睾或小睾丸、尿道下裂、小阴茎或隐匿性阴茎、

多种 DSD 表型、性别模糊、综合征型 DSD 的阳性检出率分别为 8.33%、26.32%、38.71%、57.14%、86.36%、66.67%，其辅助诊断率分别为 0.00%、15.79%、16.13%、28.57%、63.64%、50.00%。各病例组的阳性检出率与辅助诊断率结果见图 1，确诊病例基因变异与表型结果见图 2。

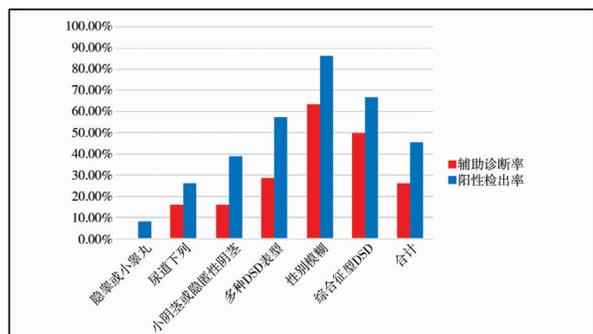


图1 各病例组的阳性检出率与辅助诊断率

Fig.1 Positive detection rate and auxiliary diagnostic rate of each case group

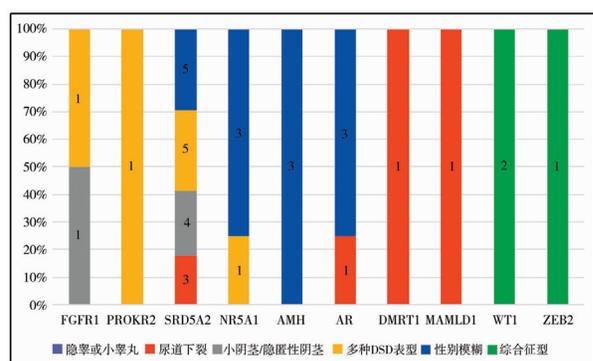


图2 确诊病例的基因变异与表型(柱状图中数字代表基因确诊病例的例数,纵轴的百分比代表同一基因突变出现不同表型的比例)

Fig.2 Gene variations and phenotypes of confirmed cases

讨论

46,XY DSD 可影响患者的生殖功能,更重要的是可能造成患儿出现心理、行为偏差,处理不当可能引起社会问题。明确其遗传学病因能更好地指导临床干预和再生育。近年来,高通量测序(NGS)技术取得了飞速的发展,在遗传缺陷疾病的分子遗传学检测领域已成为继 Sanger 测序后的新一代测序方法。当前国际上 46,XY DSD 的分子研究基础已经逐步明晰,并已尝试采用 NGS 技术进行多个 46,XY DSD 相关基因的同步检测。综合多篇报道结果^[7,13,14],与 46,XY DSD 相关的基因至少有 60 个,但不同中心纳入检测的基因数目及检测效能均不相同。该研究纳入了 2 742 个遗传性疾病相关基

因,涉及非综合征型 DSD 和综合征型 DSD 相关的 242 个基因,并覆盖 90% 以上 46,XY DSD 相关基因,增加了检测的适用性。

Berglund A 等报道的 46,XY DSD 病例基因检测的阳性检出率约为 57.14%,辅助诊断率约为 34.29%^[13];Eggers S 等报道的阳性检出率约为 57%,辅助诊断率约为 43%^[14]。而本研究的阳性检出率为 45.26%,辅助诊断率为 26.28%,接近于 Yanjie Fan 等^[15]的报道水平。同时,本研究发现不同临床表型 46,XY DSD 的阳性检出率和辅助诊断率均存在显著差异,不同病例组之间可相差 10 倍左右,其阳性检出率和辅助诊断率均与表型的严重程度及多样性呈正相关。性别模糊与综合征型 DSD 的辅助诊断率分别为 63.64% 和 50.00%,提示其遗传相关性高,其中单基因变异是主要病因,更适合进行基因检测。但本研究也发现基因检测结果对尿道下裂、小阴茎或隐匿性阴茎、多种 DSD 表型的辅助诊断率分别为 15.79%、16.13%、28.57%,这提示单基因变异虽然是诱发 DSD 的关键因素之一,但并非主要因素,环境因素也不容忽视。而单纯性隐睾或小睾丸的辅助诊断率为 0%,提示其遗传因素尚不明确,故不推荐进行分子遗传学检测。

多数学者认为 AR 变异是导致 46,XY DSD 的最常见病因,其次为 *SRD5A2* 变异^[16,17]。本研究结果显示 *SRD5A2*、*AR* 和 *NR5A1* 是 46,XY DSD 的主要相关基因。在确诊病例中,*SRD5A2* 变异者占 47.22%,*AR* 与 *NR5A1* 变异者均占 11.11%。这提示 46,XY DSD 的遗传学病因存在种族间差异,*SRD5A2* 可能是导致本地区 46,XY DSD 的最重要热点基因。

据报道,在单基因变异以外约 15% 的 DSD 是由于基因组拷贝数变异所致,其中综合征型 DSD 占 20%~30%,孤立性 DSD 为 5%~18%^[18,19]。46,XY DSD 的基因组拷贝数变异可涉及 *NROB1* (*DAX1*) 的重复、*SOX9* 上游 565kb 处增强子 13 的缺失、*SOX8* 基因座的染色体重排等。因此对于基因检测未明确病因的 46,XY DSD 病例(尤其是综合征型 DSD)可以使用染色体微阵列芯片等技术继续查找遗传学病因。

综上所述,基于 NGS 技术同时检测多个 DSD 相关基因对明确 46,XY DSD 的遗传学病因具有一定的临床意义,可考虑作为一线临床检测手段。但需要注意不同表型 46,XY DSD 的诊断率存在显著差异,建议在签署检测知情同意书时将检查结果的临床参考价值正确告知被检者(特别是对于某些诊

断效率较差的单纯性隐睾或小睾丸病例)。

参考文献

- Lee PA, CP Houk, SF Ahmed, et al. Consensus statement on management of intersex disorders [J]. International Consensus Conference on Intersex. *Pediatrics*, 2006, 118(2): e488-500. DOI: 10.1016/j.jpuro.2006.03.004.
- Arboleda VA, Lee H, Sánchez FJ, et al. Targeted massively parallel sequencing provides comprehensive genetic diagnosis for patients with disorders of sex development [J]. *Clin Genet*, 2013, 83(1): 35-43. DOI: 10.1111/j.1399-0004.2012.01879.x.
- Hull CL, Fausto-Sterling A. How Sexually Dimorphic Are We? Review and Synthesis [J]. *American Journal of Human Biology the Official Journal of the Human Biology Council*, 2003, 15(1): 112. DOI: 10.1002/ajhb.10122.
- Hughes IA, Nihoul-Fékété C, Thomas B, et al. 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. DOI: 10.1016/j.beem.2007.06.003.
- Wertheim-Tysarowska K, Gos M, Sykut-Cegielska J, et al. Genetic analysis in inherited metabolic disorders-from diagnosis to treatment. Own experience, current state of knowledge and perspectives [J]. *Dev Period Med*. 2015, 19(4): 413-431.
- Ghosh A, Schlecht H1, Heptinstall LE, et al. Diagnosing childhood-onset inborn errors of metabolism by next-generation sequencing [J]. *Arch Dis Child*, 2017, 102(11): 1019-1029. DOI: 10.1136/archdischild-2017-312738.
- Jeon YK, Yoon SO, Paik JH, et al. Molecular Testing of Lymphoproliferative Disorders: Current Status and Perspectives [J]. *Journal of Pathology & Translational Medicine*, 2017, 51(3): 224-241. DOI: 10.4132/jptm.2017.04.09.
- Ku CS, Cooper DN, Polychronakos C, et al. Exome sequencing: dual role as a discovery and diagnostic tool [J]. *Ann Neurol*, 2012, 71(1): 5-14. DOI: 10.1002/ana.22647.
- Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, et al. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery [J]. *Nat Rev Genet*, 2011, 12(11): 745-755. DOI: 10.1038/nrg3031.
- Nielsen R, Paul JS, Albrechtsen A, et al. Genotype and SNP calling from next-generation sequencing data [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2011, 12(6): 443-451. DOI: 10.1038/nrg2986.
- Yang Y, Muzny DM, Reid JG, et al. Clinical whole-exome sequencing for the diagnosis of mendelian disorders [J]. *New England Journal of Medicine*, 2013, 369(16): 1502-1511.
- Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology [J]. *Genetics in Medicine: Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 2015, 17(5): 405-424. DOI: 10.1038/gim.2015.30.
- Berglund A, Johannsen TH, Stochholm K, et al. Incidence, prevalence, diagnostic delay, and clinical presentation of female 46,XY disorders of sex development [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2016, 101(12): 4532. DOI: 10.1210/jc.2016-2248.
- Eggers S, Sadedin S, Vanden Bergen JA, et al. Disorders of sex development: insights from targeted gene sequencing of a large international patient cohort. *Genome Biol*, 2016, 17(1): 243. DOI: 10.1186/s13059-016-1105-y.
- Yanjie F, Xia Z, Lili W, et al. Diagnostic Application of Targeted Next-Generation Sequencing of 80 Genes Associated with Disorders of Sexual Development [J]. *Sci Rep*, 2017, 15(7): 44536. DOI: 10.1038/srep44536.
- Li SP, Li LW, Sun MX, et al. Identification of a novel mutation in the SRD5A2 gene of one patient with 46,XY disorder of sex development [J]. *Asian J Androl*, 2018, 20(5): 518-519. DOI: 10.4103/aja.aja_34_18.
- Hughes IA, Davies JD, Bunch TI, et al. Androgen insensitivity syndrome [J]. *Seminars in Reproductive Medicine*, 2012, 30(5): 432-442. DOI: 10.1055/s-0032-1324728.
- Croft B, Ohnesorg T, Sinclair H. The role of copy number variants in disorders of sex development. *Sex Dev*, 2018, 12(1-3): 19-29. DOI: 10.1159/000481896.
- Ledig S, Hiort O, Scherer G, et al. Array-CGH analysis in patients with syndromic and nonsyndromic XY gonadal dysgenesis: evaluation of array CGH as diagnostic tool and search for new candidate loci. *Hum Reprod*, 2010, 25(10): 2637-2646. DOI: 10.1093/humrep/deq167.

(收稿日期: 2018-11-07)

本文引用格式: 吴鼎文, 吴德华, 郑静, 等. 46,XY 性发育异常与单基因变异的相关性研究 [J]. *临床小儿外科杂志*, 2019, 18(3): 191-195. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2019.03.006.

Citing this article as: Wu DW, Wu DH, Zheng J, et al. Correlations between phenotype and monogenic mutation of 46,XY sexual development disorder [J]. *J Clin Ped Sur*, 2019, 18(3): 191-195. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2019.03.006.