

SRD5A2 基因新复合杂合功能缺失突变导致性腺发育异常分析

姚晨成¹ 田汝辉¹ 李朋¹ 陈慧兴¹ 智二磊¹ 黄煜华¹ 赵亮宇¹ 杨超¹ 张丽¹
李元杰¹ 李鑫² 李铮¹

¹上海交通大学附属第一人民医院泌尿外科中心男科(男性健康评估中心) 上海交通大学泌尿外科研究所,上海 200080;²上海交通大学附属第一人民医院超声科,上海 200080

通信作者:李铮,Email:lizhengboshi@163.com

【摘要】 目的 鉴定与尿道下裂相关的新单碱基变异及探讨该类患者子代遗传缺陷预防策略。**方法** 2019年3月上海交通大学附属第一人民医院临床收治性腺发育异常(尿道下裂伴隐睾)患者1例,通过体格检查、性激素检查、男性生殖系统B超及CT评估其男性第二性征发育、性激素水平以及男性生殖系统发育情况;利用全外显子测序(WES)检测患者与尿道下裂及隐睾相关致病基因突变位点;Sanger测序验证其家系致病基因突变位点及遗传方式;精液分析评估其生育力;并对其配偶进行类固醇5 α -还原酶2(SRD5A2)基因分析,评估子代遗传缺陷风险。**结果** 患者性腺发育异常,表现为尿道下裂伴隐睾。体格检查示患者阴毛呈倒三角分布,阴茎短小,双侧睾丸体积约8 ml。性激素检查示:卵泡刺激素(FSH)25.81 U/L,黄体生成素(LH)10.84 U/L,垂体泌乳素21.09 μ g/L,雌二醇(E₂)153 pmol/L,睾酮 16.95 nmol/L,性激素结合球蛋白36.15 nmol/L。B超提示左侧腹股沟隐睾。精液分析示:精液量为0.05 ml,精子浓度 $<2\times 10^6$ /ml,为严重少精子症。WES及Sanger PCR结果提示患者存在SRD5A2基因复合杂合功能缺失(LoF)突变[NM_000348.3: C. 679C>T (p. Arg227Ter)和NM_000348.3: C.16C>T (p. Gln6Ter)],其配偶SRD5A2基因无致病突变。**结论** 新SRD5A2复合杂合突变[NM_000348.3: C.679C>T (p. Arg227Ter)和NM_000348.3: C.16C>T (p. Gln6Ter)]可以导致性腺发育异常。

【关键词】 基因突变; 性腺发育异常; 5 α -还原酶, 2型

基金项目:国家重点研发计划(2017YFC1002003);上海交通大学医工交叉基金重点项目(YG2017ZD04)

DOI: 10.3760/cma.j.cn112137-20190913-02031

Novel compound heterozygous LoF mutations in SRD5A2 may result in disorders of sex development

Yao Chencheng¹, Tian Ruhui¹, Li Peng¹, Chen Huixing¹, Zhi Erlei¹, Huang Yuhua¹, Zhao Liangyu¹, Yang Chao¹, Zhang Li¹, Li Yuanjie¹, Li Xin², Li Zheng¹

¹Department of Andrology, Center for Men's Health, Institute of Urology, Urologic Medical Center, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China; ²Department of Ultrasound, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200080, China

Corresponding author: Li Zheng, Email: lizhengboshi@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the novel genetic cause associated with hypospadias and the strategy for preventing offspring genetic defects in these patients. **Methods** In March 2019, a patient with gonadal dysplasia (hypospadias associated with cryptorchidism) was referred to Shanghai General Hospital. His secondary sex characters, level of sex hormones and the development of male reproductive system was assessed through physical examination, sex hormone examination, male reproductive system B-ultrasound and computed tomography (CT). Whole-exome sequencing (WES) was performed to investigate the pathogenic genetic variations associated with hypospadias and cryptorchidism. Also, Sanger sequencing was conducted to verify the WES results in the pedigree. Semen analysis was used to assess the fertility of the proband and the SRD5A2 gene analysis of his spouse was performed to assess the risk of genetic defects

in the offspring. **Results** The patient suffered from gonadal dysplasia (hypospadias associated with cryptorchidism). Physical examination showed an inverted triangular distribution of pubic hair, small penis and the volume of the testis was 8 ml. Sex hormone examination revealed the level of FSH, LH, Pituitary prolactin (PRL), estrogen (E_2), testosterone (T), and sex hormone-binding globulin (SHBG) was 25.81 U/L, 10.84 U/L, 21.09 $\mu\text{g/L}$, 153 pmol/L, 16.95 nmol/L, and 36.15 nmol/L respectively. B-ultrasound and computed tomography (CT) showed left inguinal testis. Also, semen analysis illustrated that the volume was 0.05 ml and sperm concentration $<2 \times 10^6/\text{ml}$, suggesting oligospermia in this case. WES sequencing and Sanger sequencing showed compound heterozygous LoF mutations in SRD5A2 [NM_000348.3:C.679C>T(p.Arg227Ter) and NM_000348.3:C.16C>T(p.Gln6Ter)] in this patient. And there were no pathogenic genetic variations of SRD5A2 in the spouse. **Conclusion** Novel compound heterozygous LoF mutations in SRD5A2 [NM_000348.3:C.679C>T(p.Arg227Ter) and NM_000348.3:C.16C>T(p.Gln6Ter)] may be the primary cause of disorders of sex development.

【Key words】 Gene mutations; Disorders of sex development; SRD5A2

Fund program: National Key Research and Development Program of China (2017YFC1002003); Medical Engineering Joint Funds from Shanghai Jiao Tong University (YG2017ZD04)

DOI: 10.3760/cma.j.cn112137-20190913-02031

尿道下裂是儿童中最常见的性发育异常(DSD)疾病之一,即前尿道发育不全而致尿道口位于正常尿道口近端至会阴部的连线上。其通常由遗传、内分泌以及环境等多种因素导致^[1]。类固醇5 α -还原酶(SRD5A)是睾酮转变为双氢睾酮的关键酶,其异常会影响男性生殖系统发育^[2],已知类固醇5 α -还原酶2(SRD5A2)基因突变可导致尿道下裂等DSD至少有16种SRD5A2突变可以导致男性DSD(OMIM数据库,607306),但是既往研究多集中于儿童尿道下裂,该类患者成年后的生育问题以及子代的出生缺陷问题报道较少。本研究通过对成年尿道下裂患者的遗传学分析,鉴定出一种SRD5A2新复合杂合突变类型,并对其生育力进行评估及其子代遗传缺陷预防进行探讨。

对象与方法

1. 病例来源:2019年3月上海交通大学附属第一人民医院收治DSD(尿道下裂伴隐睾)患者1例,对该患者进行临床表型分析并探索其遗传学发病原因。本研究通过上海交通大学附属第一人民医院伦理委员会伦理审批(审批号:2018KY052),血液样本进行基因检测已获得患者书面知情同意。

2. 基因组DNA制备:经过先证者家系成员知情同意后,采集其外周静脉血,用DNA抽提试剂盒(TIANamp 血样DNA抽提试剂盒 DP318 TIANGEN,上海)抽提DNA,用Nanodrop 2000定量及检测DNA提取质量,DNA OD260/OD280达到1.7~1.9后进行后续实验。

3. 全外显子测序(WES):基因组DNA经

Covaris 超声波破碎仪随机打断,连接接头制备文库。带有不同标记的DNA文库混合后与特异探针进行液相杂交,经PCR线性扩增后进行2100文库质检,合格的文库即可进行高通量测序(阅尔基因,上海)。使用Agilent SureSelect人全外显子V6捕获试剂盒,测序平台选用HiSeq X Ten,平均测序深度可达150 \times 以上,Q30>90%。测序仪下机原始数据比对到人类参考基因组GRCh37/hg19,生成的“.bam”文件采用GATK系列软件进行局部重新比对,重复序列去除并进行变异检出。使用AnnoVar对变异文件进行变异注释。致病变异位点筛选原则:(1)筛选出外显子区变异、非同义突变位点;(2)ExAC_EAS、ExAC_ALL、1000Genomes等数据库中正常对照携带或携带率<1%;(3)参考dbSNP、OMIM、HGMD、ClinVar等多种数据库对致病变异位点进行评估;(4)使用SIFT、Polyphen2、LRT、MutationTaster、FATHMM等多种蛋白功能预测软件进行基因变异导致蛋白功能预测;(5)根据美国医学遗传学与基因组学学会(ACMG)分类指南以及患者的临床表型进行致病变异筛选。致病基因突变用Sanger测序验证。

4. PCR及Sanger测序:取10 ng DNA,分别设计SRD5A2突变位点引物(表1),PCR反应体系为:PCR MIX(10106ES03 翊圣生物,上海)25 μl ,前向引物 1 μl ,反向引物 1 μl ,DNA 10 ng,双蒸水(ddH_2O)补足至50 μl ;反应条件为98 $^\circ\text{C}$ 5 min,36个循环的98 $^\circ\text{C}$ 30 s、55 $^\circ\text{C}$ 30 s、72 $^\circ\text{C}$ 60 s、72 $^\circ\text{C}$ 10 min终止反应。反应产物于1.5%琼脂糖凝胶电泳35 min,Chemi DOX曝光确认单一条带后送Sanger测序。

表1 SRD5A2突变 Sanger测序引物

名称	序列	产物长 度(碱基 对)	解链温 度(°C)
MUT1-前向引物	5'-ACGGGGAGGTGAAT- GTAAAG-3'	556	55
MUT1-反向引物	5'-ACGCTACCTGTG- GAAGTAATG-3'		
MUT2-前向引物	5'-CCTCCTA- CACCTCTCCCTTATC-3'	858	55
MUT2-反向引物	5'-TCCGCTTCTTGAG- GCTTTATC-3'		

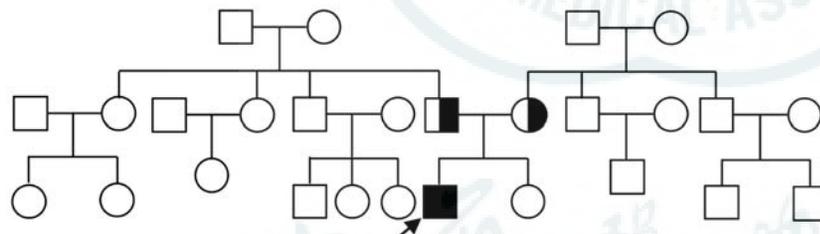
结 果

1. DSD患者临床资料:患者男,31岁,汉族,以“婚后未避孕未育1年余”收住入院。患者自幼发现双侧阴囊空虚,尿道口异位。患者于2000年行双侧睾丸下降固定术,2004年行尿道下裂手术,家系图谱见图1。专科体检:阴毛呈倒三角分布,阴茎短小(图2A),双侧睾丸体积约8 ml,双侧输精管可触及。辅助检查:(1)性激素测定:卵泡刺激素(FSH):25.81 U/L(参考值:1.27~19.26 U/L),黄体生成素(LH):10.84 U/L(参考值:1.24~8.62 U/L),垂体泌乳素:21.09 μg/L(参考值:2.64~13.13 μg/L),雌

二醇(E₂):153 pmol/L(参考值:73.4~172.5 pmol/L),睾酮 16.95 nmol/L(参考值:6.1~27.1 nmol/L);性激素结合球蛋白:36.15 nmol/L(参考值:13.3~89.5 nmol/L);(2)染色体核型:46,XY,Y染色体AZF区域未见缺失;(3)B超:双侧睾丸体积小(右侧7.31 ml,左侧7.48 ml),左侧腹股沟隐睾,双侧附睾未见异常,阴囊腔内目前未见明显积液,前列腺外形偏小(19 mm×19 mm×19 mm),后侧精囊外形偏小(右侧精囊13 mm×5 mm,左侧精囊14 mm×4.7 mm),射精管、双侧输精管未见明显异常,双侧精索静脉未见异常(图2B~F);(4)精液分析:精液量为0.05 ml,精子浓度<2×10⁶/ml,全片镜检见25条精子,12条为活动精子(少精症诊断标准:精子浓度<15×10⁶/ml),提示严重少精子症;(5)CT:左侧腹股沟管内上段类圆形稍低密度影,未下降睾丸可能。诊断:(1)男性不育症;(2)尿道下裂整形术后;(3)双侧隐睾下降固定术后。

2. 患者WES及Sanger测序结果:WES测序显示,该患者SRD5A2基因存在两种LoF基因突变[NM_000348.3:C.679C>T(p.Arg227Ter)和NM_000348.3:C.16C>T(p.Gln6Ter)],Sanger测序确认此结果,且验证先证者父母均是SRD5A2杂合突变携带者,提示该患者为复合杂合突变,其妹妹未见SRD5A2致病位点变异(图3),符合SRD5A2基因突变导致DSD的隐性遗传模式。因此,该患者为SRD5A2复合杂合突变[NM_000348.3:C.679C>T(p.Arg227Ter)和NM_000348.3:C.16C>T(p.Gln6Ter)]。

3. DSD患者辅助生育及防止子代遗传缺陷结局:为了防止该患者子代遗传缺陷及确定辅助生殖策略,通过WES对其配偶SRD5A2基因进行遗传检测,WES结果显示该患者配偶SRD5A2外显子区域未见明显异常,因此,该患者通过卵母细胞胞质内单精子注射(ICSI)技术即可生育自身健康子代。后续我们追踪了该患者新鲜周期ICSI操作后胚胎发育至囊胚过程(图4),该囊胚未见明显异常。



注:箭头示家系中先证者,黑色示SRD5A2双等位突变,半边黑色示杂合SRD5A2突变

图1 类固醇5α-还原酶2(SRD5A2)基因突变患者家系图谱



图2 类固醇5α-还原酶2突变患者专科体检及生殖系B超结果 A示患者会阴部外观; B示右侧睾丸;C示左侧睾丸;D示右侧精囊;E示左侧精囊;F示前列腺超声结果

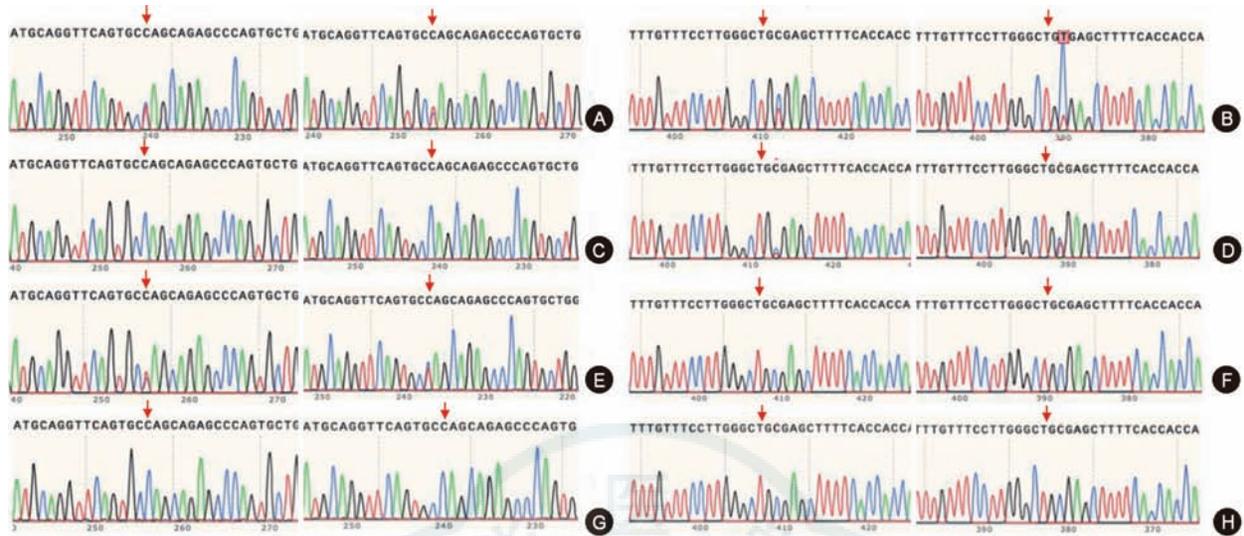


图3 类固醇5 α -还原酶2(SRD5A2)突变基因家系Sanger测序结果 A、C、E、G分别为先证者、父亲、母亲及妹妹SRD5A2基因Sanger验证结果(箭头示SRD5A2NM_000348.3:C.16C>T位点);B、D、F、H分别为先证者、父亲、母亲及妹妹SRD5A2基因Sanger验证结果(箭头示SRD5A2 NM_000348.3:C.679C>T位点)

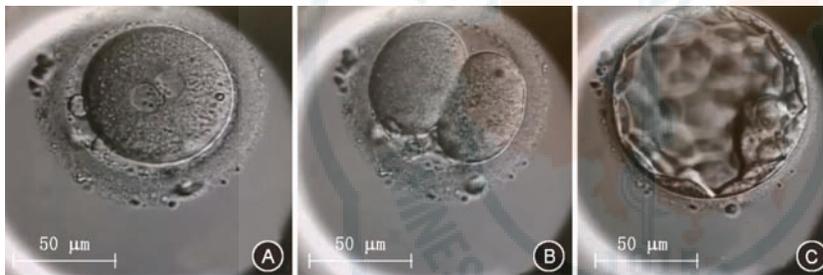


图4 光镜下观察性发育异常患者辅助生殖胚胎发育情况 A~C分别为辅助生殖后18 h、26 h及5 d胚胎发育情况

讨论

尿道下裂是一种常见的性腺发育异常疾病,典型的尿道下裂有3个特点:异位尿道口、阴茎下弯、包皮的异常分布。根据尿道口位置,可以分为4型:冠状沟型、阴茎体型、阴茎阴囊型、会阴型。尿道下裂由多种因素导致,包括:(1)胎儿睾丸雄激素的产生异常;(2)发育中外生殖器的靶器官对雄激素的敏感性受限;(3)胎儿睾丸Leydig细胞过早退化而引起雄激素刺激过早终止;(4)睾酮和双氢睾酮合成不足和雄激素受体的质量和数量缺陷^[1]。

男性生殖系统的发育主要依赖于雄激素,雄激素包括游离雄激素与结合雄激素,其中双氢睾酮在男性性腺发育过程中发挥了至关重要的作用,而SRD5A是睾酮转变为双氢睾酮的关键酶。SRD5A有两个亚型,即SRD5A1和SRD5A2。SRD5A1在胚胎时期不表达,在婴儿时期的皮肤和头皮上逐渐表达,从青春期后稳定表达在皮肤上。而SRD5A2则

不同,其高表达于胎儿的阴囊皮肤、男性附属性器官和前列腺,因此男性生殖系统的发育主要依赖于SRD5A2的作用。

尿道下裂可以为单独存在,也可以合并泌尿生殖道异常,例如单侧或双侧隐睾、前列腺退化、小阴茎、腹股沟斜疝、阴囊分叉等。其中30%的患者可以找到遗传学病

因^[3]。已有大量研究证实SRD5A2突变可以导致尿道下裂,SRD5A2定位于2号染色体2区3带1亚带,编码一个254个氨基酸的蛋白,其N端是雄激素结合结构域,C端是NAPDH结合结构域^[4],可以将睾酮转变为更具活性的双氢睾酮,从而参与调控男性生殖系统发育。已经明确与尿道下裂有关的SRD5A2突变位点有16个,包括:DEL、ARG246TRP、MET157DEL、LEU55GLN、GLY115ASP、GLY183SER、ARG227TER、PRO251DEL、ALA228THR、GLY196SER、HIS231ARG、HIS231ARG、PRO212ARG、GLU197ASP、TYR26TER、ARG227GLN (OMIM:607306)。同时有文献表明,SRD5A2的拷贝数变异(CNV)变异也与DSD相关^[5]。

本文患者为后段型尿道下裂,伴双侧隐睾、小阴茎以及前列腺与精囊发育不良,无阴囊分叉和腹股沟斜疝等症状。该患者为SRD5A2的复合杂合突变[NM_000348.3:C.679C>T(p.Arg227Ter)和NM_000348.3:C.16C>T(p.Gln6Ter)],该突变类型

尚未见报道。Vilchis 等^[6]首次报道了 SRD5A2 突变 [NM_000348.3:C.679C>T(p.Arg227Ter)] 可引起尿道下裂,家系中两兄弟都为假性阴道会阴阴囊型尿道下裂,伴小阴茎和双侧睾丸体积减少,但该位点在中国人人群中未见报道。而另外一个位点 [NM_000348.3:C.16C>T(p.Gln6Ter)] 首次发现于 1 名日本女性精原细胞瘤患者,近期有文献表明,在 1 例中国 DSD 患者中发现了该突变位点^[7-8],该位点未收录到 OMIM 数据库中,根据 ACMG 指南及以往文献报道明确该位点为 SRD5A2 致病突变位点^[9]。

以往尿道下裂患者的遗传学病因研究主要集中在青少年,而 SRD5A2 突变患者后期的生育问题报道甚少。本例患者的雄激素水平正常,精液量偏少为严重少精子症。SRD5A2 突变患者由于不能合成双氢睾酮,其阴茎、精囊和前列腺发育不良,导致精液量减少。而睾丸的精子发生不依赖于双氢睾酮,而是由睾丸内局部睾酮水平决定,SRD5A2 突变患者只有在合并隐睾时才会发生少精子症^[10],提示该患者的少精子症是由于隐睾导致,而非双氢睾酮缺乏的直接作用。也有文献表明,SRD5A2 突变患者精液质量可为正常^[9]。因此,不同的 SRD5A2 突变位点可导致不同的临床表型,当合并前列腺与精囊腺的发育不良时可以导致精液量的减少,合并隐睾可以导致少弱精子症。SRD5A2 突变与男性生育力的关系值得深入探究,怎样防止 SRD5A2 突变患者子代遗传缺陷同样是男科医师应该关注的问题。SRD5A2 突变导致的尿道下裂为常染色体隐性遗传疾病,在评估患者生育力的时候,应该对其配偶进行 SRD5A2 基因分析,如果配偶不携带 SRD5A2 突变,根据其精液质量,可以选择不同的辅助生殖方法,如宫内人工授精(IUI)、常规体外受精(IVF)以及 ICSI^[11]。如果配偶携带 SRD5A2 基因致病突变,可以采用胚胎植入前遗传学检测(PGT)技术防止其子代遗传缺陷。本研究中患者的配偶未发现 SRD5A2 致病性基因突变,因此可采用 ICSI 辅助生殖手段生育子代。后续研究可以对该类患者进行全基因组的分析,有助于找到

更多与 DSD 相关的致病基因位点,而 SRD5A2 突变对男性生育力的影响也还需要更大样本的基础与临床研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

- [1] van der Zanden LF, van Rooij IA, Feitz WF, et al. Aetiology of hypospadias: a systematic review of genes and environment[J]. Hum Reprod Update, 2012, 18(3): 260-283. DOI: 10.1093/humupd/dms002.
- [2] Thigpen AE, Davis DL, Gautier T, et al. Brief report: the molecular basis of steroid 5 alpha-reductase deficiency in a large Dominican kindred[J]. N Engl J Med, 1992, 327(17): 1216-1219. DOI: 10.1056/NEJM199210223271706.
- [3] Bouty A, Ayers KL, Pask A, et al. The genetic and environmental factors underlying hypospadias[J]. Sex Dev, 2015,9(5):239-259. DOI: 10.1159/000441988.
- [4] Cheng J, Lin R, Zhang W, et al. Phenotype and molecular characteristics in 45 Chinese children with 5 α -reductase type 2 deficiency from South China[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2015, 83(4):518-526. DOI: 10.1111/cen.12799.
- [5] Andonova S, Robeva R, Vazharova R, et al. New territory for an old disease: 5-alpha-reductase type 2 deficiency in bulgaria [J]. Sex Dev, 2017,11(1):21-28. DOI: 10.1159/000454974.
- [6] Vilchis F, Canto P, Chávez B, et al. Molecular analysis of the 5 alpha-steroid reductase type 2 gene in a family with deficiency of the enzyme[J]. Am J Med Genet, 1997, 69(1): 69-72.
- [7] Sasaki G, Nakagawa K, Hashiguchi A, et al. Giant seminoma in a patient with 5 alpha-reductase type 2 deficiency[J]. J Urol, 2003, 169(3): 1080-1081. DOI: 10.1097 / 01.ju.0000047621.66463.29.
- [8] 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.
- [9] Yuan S, Meng L, Zhang Y, et al. Genotype-phenotype correlation and identification of two novel SRD5A2 mutations in 33 Chinese patients with hypospadias[J]. Steroids, 2017, 125:61-66. DOI: 10.1016/j.steroids.2017.06.010.
- [10] Kang HJ, Imperato-McGinley J, Zhu YS, et al. The effect of 5alpha-reductase-2 deficiency on human fertility[J]. Fertil Steril 2014, 101(2): 310-316. DOI: 10.1016/j.fertnstert. 2013. 11.128.
- [11] Mendonca BB, Batista RL, Domenice S, et al. Steroid 5 α -reductase 2 deficiency[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2016,163:206-211. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2016.05.020.

(收稿日期:2019-09-13)

(本文编辑:周阳)