

# Sry 基因的研究进展

李秀蓉, 李麓芸, 卢光

(中南大学 湘雅医学院人类生殖工程研究室, 中国湖南 长沙 410078)

**摘要:** 性别决定基因(Sex region of Y chromosome, 人类以 SRY、小鼠以 Sry 表示)的研究进展是近几年来人类在性别决定、性别分化研究中获得的最大突破性成果。该文从 SRY(Sry) 发现前关于性别决定因子的研究、SRY(Sry) 的确定、小鼠 Sry 结构的研究、小鼠 Sry 的表达研究及 Sry 下游基因的确定等 5 个方面对小鼠 Sry 的研究进展进行综述, 对进一步深入研究 Sry 下游基因存在的瓶颈问题作了一定的分析, 并提出核移植技术可能为研究 Sry 的调节及其下游基因所需的特殊实验材料展现了新的希望。

**关键词:** 性别决定基因; 小鼠; 基因

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2001) 01-0025-04

## Research Development for Sry Gene

LI Xiu-rong, LI Lu-yun, LU Guang-xiu

(The Human Reproductive Engineering Lab of Xiangya Medical College, Central South University, Changsha 410078, Hunan, China)

**Abstract:** Several breakthroughs have been made in the field of sex determination and sex differentiation in past few years. The study of the testis determining factor before SRY/Sry's discovery, confirmation of SRY/Sry, research achievements on the structure or expression of mouse Sry and investigation into its downstream genes *et al* were reviewed. Further research on Sry's downstream genes was also suggested and commented.

**Key words:** sex region of Y chromosome; mouse; gene

(Life Science Research, 2001, 5(1): 25~28)

性别决定基因(Sex region of Y chromosome)的研究进展是近几年来人类在性别决定、性别分化研究中获得的最大突破性成果。50年代以前还象谜团一般有关性别决定、性别分化的问题, 随着细胞、分子生物学技术迅速发展, 被逐步剥去层层神秘色彩, 在染色体、DNA 水平上得到阐明。

### 1 SRY(Sry) 发现前关于性别决定因子的研究

20世纪50年代通过对 47XXY、48XXXY、

48XXYY、49XXXXY 的病例研究, 发现这些个体均有睾丸发育, 提示只要有 Y 染色体存在就决定了生殖腺、器官向雄性方向分化<sup>[1,2]</sup>, 从而确定了人类 Y 染色体对其睾丸发育具有特异性。以后人们怀着浓厚的兴趣开始寻找睾丸决定因子(testis determining factor, TDF)。1985~1987年从 X-Y 相互易位产生的性反转病例研究中, 将 TDF 定位于 Y 染色体短臂紧邻拟常染色质区<sup>[3-5]</sup>。1987~1988年, 组织相容性 H-Y 抗原(histocompatibility H-Y antigen, HYA)被第一个当作 TDF 候补基因。1988年从人类 Y 染色体短臂上克隆到的

收稿日期: 2000-09-26; 修回日期: 2001-02-08

基金项目: 卫生部基金资助项目(98-1-109)

作者简介: 李秀蓉(1957-), 女, 湖南长沙人, 中南大学湘雅医学院副研究员, 博士研究生, 从事早期人类胚胎发育遗传及遗传病防治研究, E-mail: xiurongli00@hotmail.com; 李麓芸(1937-), 女, 湖北武汉人, 教授, 博士生导师, 从事遗传病的诊断和预防研究; 卢光(1939-), 女, 湖北天门人, 教授, 博士生导师, 主要从事人类生殖细胞和早期胚胎发育遗传研究。

Y 染色体上的锌指蛋白基因 (zinc-finger Y, ZFY) 被当作 TDF 候补基因, 但是后来发现有袋动物和单孔目动物 ZFY 定位于常染色体上, 而且小鼠实验也不支持 ZFY 是 TDF. 至 1989 年从 4 例 XX 男性的病例分析得知有 Y 染色体短臂的衍生片段而无 ZFY 结构, 又将 TDF 定位范围缩小至  $60 \times 10^3$  bp 之内, 因此 ZFY 被否认具有 TDF 功能<sup>[6-8]</sup>. 1990 年通过对 XX 男性 Y 染色体断裂点位置的详细分析, 将 TDF 定位进一步局限于  $35 \times 10^3$  bp 范围之内<sup>[6,9]</sup>.

## 2 SRY(Sry) 的确定

Gubbay J 等<sup>[9]</sup>提出: TDF 候选基因的确定需满足以下条件: 1) 在所有哺乳动物中的 Y 染色体上均存在, 为一高度保守的序列; 2) 必须被定位在与雄性发育相关的 Y 染色体最小的范围内. 在人类, 它是 Y 染色体短臂拟常染色质区邻界  $35 \times 10^3$  bp 范围之内, 而小鼠 Sry 必须定位在 Sxr' 小鼠提示 Y 染色体上的最小范围内, Sxr' 小鼠即保存有小鼠的睾丸决定因子 (Tdy), 而小鼠的组织相容性 H-Y 抗原 (HyA) 和小鼠生精功能有关的基因 (Spy) 均为缺失; 3) 这个候选基因能说明 XY 性反转发生的分子基础; 4) 其表达时间与 TDF 作用时间保持一致性.

1990 年在 Nature 上有文章报道了从人类 Y 染色体  $35 \times 10^3$  bp 片段内克隆到 SRY 基因和从小鼠 Sxr' 提示的范围内克隆到 Sry 基因<sup>[6,9]</sup>, 并加以命名. Sinclair 等通过检索 EMBL DNA 数据库和 PIR 蛋白质数据库, 查到其构建的人类 Y 特异性片段克隆 pY53.3 含有一高迁移率组 (High mobility group, HMG) 同源盒. 后者编码一组非组蛋白核蛋白, 具有能与 DNA 结合、起转录调节作用的功能; 并检测到 SRY 在睾丸组织中特异性表达, 在卵巢及男性的肺、肾和淋巴细胞株中均无表达; 对多种哺乳类动物包括黑猩猩、兔、猪、马、虎和牛等进行 SRY 检测, 发现雄性均为阳性, 而雌性均为阴性, 具有鲜明的性别特异性. John Gubbay 等利用 pY53.3 探针针对正常 XY 雄性小鼠和 XX 性反转 (sex-reversed mutation, Sxr) 雌性小鼠 DNA 进行 Southern 杂交检测, 发现也有 Y 特异性阳性信号; 进行了 pY53.3 小鼠同源序列的克隆; 并检测到 Sry 在小鼠胚胎尿生殖嵴上有表达, 其时间与 TDF 作用时间一致. 在 Sry 开读框架中同样有 HMG 同源盒, 其中 471 个碱基

中人和小鼠的同源性达 62%. 在 XY 雌性小鼠中检测到有 Sry 的缺失. 他们同时将 SRY 认定为 TDF 最佳候补基因. 1991 年 Sry 转基因 (EMBL X67204) 小鼠制备成功<sup>[10]</sup>, 使 XX, Sry 转基因小鼠有睾丸发育, 证实了 Sry 就是 TDF. 1992 年报告了 SRY (Sry) 为一个外显子的单拷贝基因, 其 HMG 同源盒内的突变导致了人类 46, XY 完全女性化的病例, 进一步支持了 SRY 就是 TDF 的判断<sup>[11,12]</sup>.

## 3 Sry 结构的研究

从 1990 年以来, Sry 结构已经有相当充分的研究. 首先, Sinclair 和 Gubbay 等<sup>[6,9]</sup>报告了 SRY/Sry 含有一 HMG 同源盒. HMG 蛋白质是一类大家族, 可分为三组: 1) HMG-14/-17 组; 2) HMG-1/-2 组; 3) HMG-1/-Y 组. SRY 属于 HMG-1/-2 组. 它可能与核糖体 RNA 基因的启动子结合, 激活该基因的转录. SRY 开读框架中间为编码 80 个氨基酸、在哺乳动物中高度同源序列 HMG; 起始位点 5' 端前有一拼接位点; 越往 3' 端种属差异越大; 在终止密码下游有一 Poly-A 信号. 于 1992 年 Gubbay 等分析了小鼠 gDNA 文库中 7 个互相重叠的 Sry 阳性克隆的插入子 (片段约为  $33 \times 10^3$  bp) EcoR 1 酶切位点, 得知 Sry 基因位于中间  $2.8 \times 10^3$  bp 的单拷贝序列内 ( $7480 \sim 10219$ )<sup>[13,14]</sup>, 两侧是至少有  $15 \times 10^3$  bp 的反向重复序列; 尽管两侧的反向重复序列几乎是一致的, 但也存在至少 7 个碱基的差异, 还有 CA 二核苷酸重复. 某些 CA 重复具有多态性. Blanche Capel<sup>[14]</sup>等通过对成鼠睾丸 Sry 表达的研究, 又确定了 Sry 开读框架 (open reading frame, ORF) 起始于 8295 (根据 EMBL, X67204 编号), 该框架的终止密码 TAG 位于 9486; 并发现成鼠睾丸中 Sry 转录产物 90% 为环状 RNA, 进一步确定 Sry 剪切供体位点 (8201) 和剪切受体位点 (9432) 的位置, 这种正常的剪切反应导致一个由 1231 个碱基构成的环状的外显子; 根据 Sry 在胚胎生殖嵴和睾丸精原细胞表达的不同, 提出 Sry 至少有两个启动子, 一个在生殖嵴体细胞表达时起作用, 位于单拷贝序列内; 另一个在成年睾丸精原细胞中表达时起作用, 在 5' 端反向重复序列中. 通过 RT-PCR 对小鼠生殖嵴体细胞表达的研究<sup>[15]</sup>, 进一步明确 Sry 的结构, 与小鼠生殖嵴体细胞表达有关的启动子位于 8011 ~ 8032; 三个 ATG 翻译

起始位点分别位于 8 193, 8 242 和 8 304, 其中 8 304 的 ATG 为主要的翻译起始位点; HMG 同源盒位于 8 304 ~ 8 546, 在 *Mus musculus musculus* 小鼠的 Sry 阅读框架内含有一段 CAG 重复序列 8 793 ~ 9 401 (在人类 SRY 没有发现相同重复序列); 9 720 ~ 9 790 有 4 个 ATTTA 序列; 终止密码位于 11 575 和 12 969/70, 后者起主要作用. 1997 年 Susanna Dolci 等<sup>[16]</sup> 将在成鼠睾丸生殖细胞内 Sry 表达有关的启动子定位于 5 640 ~ 6 178/6 197 之间. 目前, Sry 基因结构可如图 1 所示:

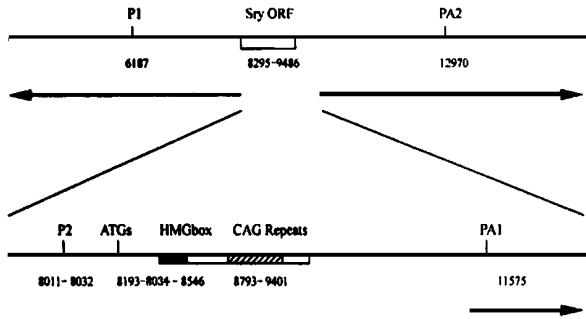


图 1 Sry 基因位点示意图

P1, P2: 启动子 1, 启动子 2; PA1, PA2: polyA1, polyA2.

Fig. 1 Structure of the mouse Sry gene

P1, P2: promoter 1, promoter 2; PA1, PA2: polyA1, polyA2.

#### 4 Sry 的表达研究

在 1990 年 Sry 转基因小鼠的研究中发现, 大约于性交后 12.5 d 的小鼠胚胎出现代表睾丸发育的第一个肉眼可见的信号即从生殖嵴分化产生的睾丸索<sup>[10]</sup>. 接着以小鼠为材料进行了最精确的个体发育方面的研究, 检测到 Sry 在性交后 10.5 ~ 12.5 d 于生殖嵴体细胞表达, 11.5 d 是高峰时间<sup>[15, 17-19]</sup>. 这种表达发生在支持细胞中, 引起支持细胞分化产生 Sertoli 细胞. 通过对成鼠睾丸 Sry 表达的研究表明<sup>[4]</sup>, 成鼠睾丸 Sry 的表达开始于小鼠出生后 21 ~ 28 d. 这时的表达依赖于睾丸生殖细胞的存在, 并伴随着精原细胞的出现和第一次生精功能高峰的产生. Sry 在睾丸的表达不同于胚胎生殖嵴, 其转录产物 90% 为环状 RNA (图 2). 它特异性地存在于精原细胞的胞浆中. 推测环状 RNA 可能为一种无功能的 RNA 存在, 以调节其转录水平. 利用 RT-PCR 和 RACE-PCR 对交配后 11.5 和 13.5 d 的小鼠胚胎生殖嵴 Sry 表达进行深入研究, 发现既有 Sry 的线状

RNA 存在, 同时也可检测出少量 Sry 的环状 RNA, 其意义还有待于进一步探讨.

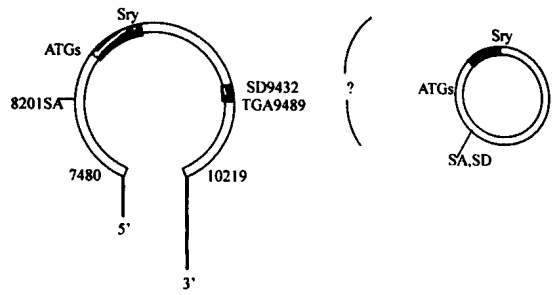


图 2 RNA 前体及环状 RNA 结构示意图

SA: 剪切受体位点, SD: 剪切供体位点

Fig. 2 Structure of primary and circular RN

SA: splice acceptor, SD: splice donor

SRY 蛋白质是一种能与特异性 DNA 序列结合的转录因子<sup>[20-22]</sup>. 它的 HMG 同源盒编码 77 个氨基酸, 第 8 位的苯丙氨酸、第 45 位的色氨酸、第 53 位的赖氨酸在 80% 的 HMG 同源盒中是高度保守的. SRY 能特异性识别 A/TAAACAAT 作为保守的 DNA 结合位点, 这一保守序列存在于编码 P450 芳香化酶和抗苗勒氏管激素 (AMH) 基因的启动子序列中<sup>[21]</sup>. SRY 蛋白质的作用即有 DNA 结合的碱基序列特异性又有空间结构特异性<sup>[17]</sup>, 结合 DNA 后还能引起该 DNA 弯曲变形<sup>[21]</sup>. 很多实验表明 Sry 的表达水平对于性别决定是个关键因素, 具有高度敏感的剂量效应<sup>[23]</sup>. Sry 转录水平的调节还不清楚, Sry 转录后、翻译和翻译后水平的调节可能需要其它多种蛋白质的相互作用; ORF 3' 端非翻译区  $3.5 \times 10^3$  bp 区域可能与转录物的稳定性、剪切或翻译有关<sup>[23]</sup>.

#### 5 Sry 的下游基因确定

通过性腺发育缺陷的基因突变体的分析, 利用生殖嵴细胞株进行的体外研究以及两性性腺发育早期差异表达探讨, 现在已有抗苗勒氏管激素 (Anti-Mullerian Hormone, AMH, 或苗勒氏管抑制物 Mullerian-Inhibiting Substance, MIS)、甾体生成因子 1 (Steroidogenic Factor 1, SF1)、Desert hedgehog (Dhh) 和成骨蛋白 8 (Bone morphogenic protein 8, Bmp8) 等被列为 Sry 下游基因的候选基因. 但是 AMH 的 SRY 结合位点发生突变并不影响 AMH 的活性, 这似乎说明 AMH 不是 SRY/Sry 直接结合的靶位点; 而在

Dhh 和 Bmp8 两种缺失突变体内睾丸发育均正常。这些发现使人们对 AMH、Dhh、Bmp8 列为 Sry 直接作用的下游基因产生质疑。要鉴定 Sry 特异性下游基因是非常困难的<sup>[23]</sup>。原因可能是: 1) Sry 作为一个转录因子启动的是一种放大式级联反应。Sry 本身表达量非常低, 至今未能用 Northern blot 检测出 Sry 蛋白质表达, 在制备小鼠 Sry 蛋白质抗体方面的努力也没能成功。这对研究 Sry 蛋白质的直接作用造成困难, 无法研究 Sry 蛋白质在发育过程中的作用以及作用位点; 2) 目前没有供分析、鉴定 Sry 下游基因研究可利用的体外细胞培养系统, 而且涉及调节 Sry 和下游基因的一组互相作用的蛋白质可能仅存于 Sry 自然表达的细胞内; 3) 曾有人利用正常的 XX 雌性和 XY 雄性小鼠胚胎进行性腺发育早期表达差异显示研究, 但没有获得有特殊意义的信息。推测可能与 Y 染色体上其它基因和其它染色体上的基因表达丰度高, 掩盖了 Sry 表达引起差异显示提供的特殊信息有关; 4) Sry 转基因 XX 雄性小鼠为研究 Sry 的调节及其下游基因提供了很好的实验动物, 但转基因动物功效成为利用这一途径进行研究的限速步骤, 核移植技术为提供研究 Sry 的调节及其下游基因所需的特殊实验材料展现了新的希望。

#### 参考文献 (References):

- [ 1 ] FORD C E, JONES K W, POLANI P E, *et al.* A sex-chromosome anomaly in a case of gonadal dysgenesis (Turner's syndrome) [J]. *Lancet*, 1959, 1: 711-712.
- [ 2 ] JACOBS P A, STRONG J A. A case of human intersexuality having a possible XXY sex-determining mechanism [J]. *Nature*, 1959, 183: 302-303.
- [ 3 ] WEISSENBACH J, LEVILLIRES J, PETIT C, *et al.* Normal and abnormal interchanges between the human X, Y chromosomes [J]. *Development*, 1987, 101 (Suppl): 67-74.
- [ 4 ] BISHOP C E, BOURSOT P, BURON B, *et al.* Most classical *Mus musculus* laboratory mouse strains carry a *Mus musculus* Y chromosome [J]. *Nature*, 1985, 315 (6014): 70-72.
- [ 5 ] AFFARA N A, FERGUSON-SMITH M A, MAGENIS R E, *et al.* Mapping the testis determinants by an analysis of Y-specific sequences in males with apparent XY and XO karyotypes and females with XY karyotype [J]. *Nucleic Acids Res*, 1987, 15 (18): 7325-7342.
- [ 6 ] SINCLAIR A H, BERTA P, PALMER M S, *et al.* Agene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DN-binding motif [J]. *Nature*, 1990, 346 (6281): 240-244.
- [ 7 ] KOOPMAN P, GUBBAY J, COLLIGNON J, *et al.* Zfy expression patterns are not compatible with a primerian role in sex determination [J]. *Nature*, 1989, 343 (6252): 940-942.
- [ 8 ] PALMER M S, SINCLAIR A H, BERTA P, *et al.* Genetic evidence that ZFY is not testis-determining factor [J]. *Nature*, 1990, 342 (6252): 937-939.
- [ 9 ] GUBBAY J, COLLIGNON J, KOOPMAN P, *et al.* A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes [J]. *Nature*, 1990, 346 (6281): 245-250.
- [ 10 ] KOOPMAN P, GUBBAY J, VIVIAN N, *et al.* Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry [J]. *Nature*, 1991, 351 (6322): 119-122.
- [ 11 ] FOSTER J W, BRENNAN F E, HAMPIKIAN G K, *et al.* Evolution of sex determination and the Y chromosome SRY-related sequences in marsupials [J]. *Nature*, 1992, 359 (6395): 531-533.
- [ 12 ] HAWKINS J R, TAYLOR A, BERTA P, *et al.* Mutational analysis of SRY: nonsense and missense mutations in XY sex reversal [J]. *Hum Genet*, 1992, 88 (4): 471-474.
- [ 13 ] GUBBAY J, VIVIAN N, ECONOMOU A. Inverted repeat structure of the Sry locus in mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89 (17): 7953-7957.
- [ 14 ] CAPEL B, SWAIN A, NICOLIS S, *et al.* Circular transcripts of the testis-determining gene Sry in adult mouse testis [J]. *Cell*, 1993, 73 (5): 1019-1030.
- [ 15 ] HACKER A, CAPEL B, GOODFELLOW P, *et al.* Expression of Sry, the mouse sex determining gene [J]. *Development*, 1995, 121 (6): 1603-1614.
- [ 16 ] DOLCI S, GRIMALDI P, GEREMIA R, *et al.* Identification of a promoter region generating Sry circular transcripts both in germ cells from male adult mice and in male mouse embryonal gonads [J]. *Biol Reprod*, 1997, 57 (5): 1128-1135.
- [ 17 ] HAQQ C M, DONAHOE P K. Regulation of sexual dimorphism in mammals [J]. *Physiol Rev*, 1998, 78 (1): 1-33.
- [ 18 ] KOOPMAN P, MÜNSTERBERG A, CAPEL B, *et al.* Expressing of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature*, 1990, 348: 450-452.
- [ 19 ] JESKE Y W A, BOWLES J, GREENFIELD A, *et al.* Expression of a linear Sry transcript in the mouse genital ridge [J]. *Nature Genetics*, 1995, 10 (4): 480-482.
- [ 20 ] HARLEY V R, LOVELL-BADGE R, GOODFELLOW P N. Definition of a consensus DNA binding site for SRY [J]. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22 (8): 1500-1501.
- [ 21 ] HARLEY V R, GOODFELLOW P N. The biochemical role of SRY in sex determination. *Mol Reprod Develop* 1994, 39 (2): 184-193.
- [ 22 ] HAQQ C M, KING C Y, DONAHOE P K, *et al.* SRY recognizes conserved DNA sites in sex-specific promoters [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90 (3): 1097-1101.
- [ 23 ] BLANCHE CAPEL. Sex in the 90 s: SRY and the switch to the male pathway [J]. *Annu Rev Physiol*, 1998, 60: 497-523.