

一新型 *SOX9* 基因致病性突变: R178L(G→T)

朱敏,袁灿,周钢,谢慎思,胡维新

(中南大学 湘雅医学院 分子生物学研究中心, 中国湖南 长沙 410078)

摘要: 人 *SOX9* 基因同时参与胚胎骨骼形成和睾丸发育调控. 对一例多发畸形的早产女性胎儿进行 *SRY* 基因扩增和 *SOX9* 基因突变分析, 发现其具有男性特异性 *SRY* 基因, 且 *SOX9* 基因发生 R178L(G→T) 的突变, 提示该病例为 *SOX9* 基因突变导致的广泛性先天发育不良合并常染色体男→女性性反转. 该突变此前未见报道, 这也是中国人中首次报道致病性 *SOX9* 基因突变.

关键词: 广泛性先天发育不良; 46, XY 性反转女性; *SOX9* 基因

中图分类号: Q754; Q755

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2004)02-0122-04

A New Type of Deleterious *SOX9* Gene Mutation: R178L(G→T)

ZHU Min, YUAN Can, ZHOU Gang, XIE Shen-si, HU Wei-xin

(Molecular Biology Research Center, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, Hunan, China)

Abstract: *SOX9* gene is involved in both bone formation and testis development. Sequence analysis of a PCR fragment containing part of *SOX9* gene from a phenotypically female infant with several sorts of congenital malformation revealed a point mutation of R178L(G→T), while a male-specific fragment of *SRY* gene was also amplified from its genomic DNA. These results suggest that the missense mutation in *SOX9* may have caused CD syndrome and autosomal sex-reversal in this case. This is an unreported *SOX9* mutation before and also the first report of deleterious *SOX9* mutation in Chinese.

Key words: campomelic dysplasia; 46, XY sex-reversed female; *SOX9* gene

(*Life Science Research*, 2004, 8(2): 122 ~ 125)

人 *SOX9*(*SRY*-type HMG box gene 9) 是一种重要的早期胚胎发育相关基因, 定位于染色体 17q24.3~qter, 全长转录单位 3 934 bp, 含 3 个外显子, 编码 509 个氨基酸, 其中 104~182 位构成 HMG(high mobility group) 盒, C 端有富含脯氨酸和谷氨酰胺的转激活作用区域(transactivation do-

main, TA), 属于高泳动类转录因子超家族. 已报道发生在其 HMG 盒和 TA 域内数种突变能引起广泛性先天发育不良 CD(campomelic dysplasia), 并常伴有 46, XY 女性性反转(46, XY sex-reversed female), 表明 *SOX9* 基因同时参与了骨骼发育和性别分化过程^[1-4].

收稿日期: 2004-02-16; 修回日期: 2004-04-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39900159)

作者简介: 朱敏(1969-), 女, 湖南长沙人, 博士, 从事分子生物学研究, Tel: +86-0731-4805449, E-mail: zhumin0678@yahoo.com; 胡维新(1950-), 男, 湖南汝城人, 中南大学教授, 通讯作者, 从事分子生物学研究, Tel: +86-0731-4805449, E-mail: weixinhu@pub-

1 材料与方法

1.1 材料

1) 病例介绍: 一早产女婴, 孕龄 32 周, 产前 B 超检查及死后病理解剖结果表明该患儿有多发畸形, 包括脑积水、脊柱裂(于 T12 至 L4 约 3.4 × 3 cm 裂口)、膈疝、双足内翻、右位心缺如、双肾缺如等, 但子宫、输卵管及卵巢等均发育, 与胎龄相符。资料及组织标本来自湘雅三医院病理科。

2) 试剂: 基因组纯化试剂盒、Taq DNA 聚合酶、PCR 纯化试剂盒及 T 载体试剂盒均购自 Promega 公司。

扩增 *SOX9* 基因上游引物 P1: 5' GACAGTTTGGCGGATTCACCT 3', 下游 P2: 5' TCGCTCATGCCGGAGGAGGAG 3', 产物为 285 bp; 扩增 *SRY* 基因上游引物 AP1: 5' GAATT-TATCCCCGCTCTCCGG 3'; 下游引物 AP2: 5' GGAATTCACAACCTGTTGTCCAGTTG C 3', 产物为 436 bp。由上海生工公司合成。

1.2 方法

1.2.1 组织处理及基因组 DNA 提取

病例为福尔马林固定的组织块, 取其中深部脑组织依次经 0.9% NaCl 溶液和灭菌双蒸水于 4 °C 反复浸泡过夜, 洗涤数次, 然后用试剂盒提取基因组 DNA。

同时取无关正常男性和女性外周血提取基因组 DNA 作为对照。

1.2.2 *SRY* 和 *SOX9* 基因扩增

在 50 μl 总体积中进行, 内含每种 dNTP 200 μmol/L, 每种扩增引物 10 pmol, 1.0 μg 基因组 DNA, 2U Taq DNA 聚合酶。

扩增循环参数为: 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共循环 30 次, 最后于 72 °C 充分延伸 10 min。

扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 PCR 产物克隆及序列分析

分别按照试剂盒操作说明书进行 PCR 产物纯化及其 T 载体克隆重组, 序列分析由大连宝生物公司进行。

2 结果

2.1 PCR 扩增

从正常成年女性及患儿基因组 DNA 中均扩增获得大小未见异常的 *SOX9* 基因产物。同时该

患儿与阳性对照一样, 还获得 *SRY* 基因目的扩增产物, 正常成年女性则无该片段产生(图 1)。

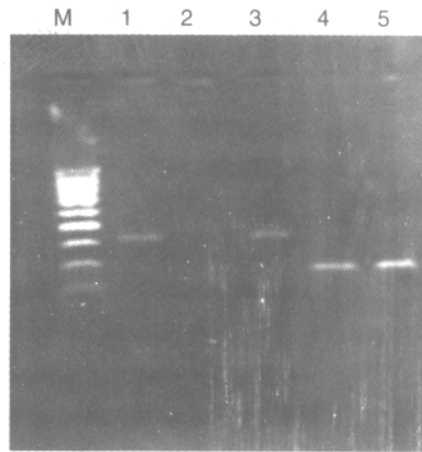


图 1 *SRY* 和 *SOX9* 基因扩增产物电泳检测

M: 100 bp DNA 梯级分子量标志; 1: 正常成年男性 *SRY* 扩增(阳性对照); 2: 正常成年女性 *SRY* 扩增(阴性对照); 3: 患儿 *SRY* 扩增; 4: 正常女性 *SOX9* 基因扩增; 5: 患儿 *SOX9* 基因扩增。

Fig. 1 Electrophoresis analysis of PCR products of *SRY* and *SOX9* genes

M: 100 bp DNA Ladder Marker; Lane 1: *SRY* amplification of normal male(positive control); Lane 2: *SRY* amplification of normal female(negative control); Lane 3: *SRY* amplification of the fetus; Lane 4: *SOX9* amplification of normal female; Lane 5: *SOX9* amplification of the fetus.

2.2 序列分析

结果表明病例 *SOX9* 基因 HMG box 内发生单碱基置换突变 R178L(G→T), 如图 2 所示, 左侧正常对照第 225 位碱基为 C, 而该患儿为 A(反义链中)。

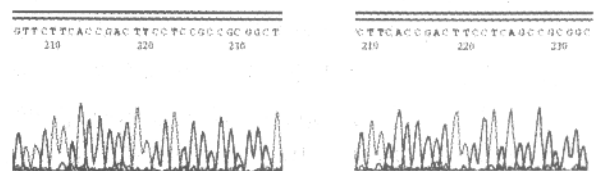


图 2 序列分析结果

左: 正常对照; 右: 患儿。

Fig. 2 Results of sequence analysis

Left: the normal female control; Right: the fetus.

3 讨论

SOX9 基因是软骨发育中最关键的转录激活因子, 显著表达于胚胎间叶细胞浓积层、软骨原基和软骨直至完全分化的软骨细胞中^[5, 6]。编码主要软骨基质蛋白 II 型胶原的 *Col2a1* 为其靶基因: *Col2a1* 内含子 1 中含一个软骨特异性增强子元件, 为 *SOX9* 蛋白结合位点, 所形成的 DNA-蛋白复合物通过 TA 域行使转录因子功能, 即 *SOX9* 直接激活靶基因 *Col2a1* 的软骨细胞特异性表达^[7, 8]。这种转录激活调控构成软骨细胞分化程序的一个基本要素, 为 *Col2a1*、*Col9a2*、*Col11a2* 和 *Aggrecan* 等一系列软骨细胞特异性标志基因表达所必需^[9], 故 *SOX9* 活性下降或失活将抑制 II 型胶原和/或其他软骨基质蛋白, 从而导致严重影响全部软骨衍生结构的发育异常 CD- 这是一种罕见的先天性骨骼畸形综合症, 临床症状多变, 主要以先天弯弓和长骨角化合并其他多种骨骼及骨骼外缺陷为特征, 患者多因呼吸失败而新生死亡^[1-4, 6]。

本例早产死婴的多发畸形疑为 CD, 得到其 *SOX9* 基因突变分析证实: 错义突变 R178L(G→T) 导致患儿 *SOX9* HMG 盒氨基酸序列改变。作为高泳动类转录因子, *SOX9* 蛋白由其 HMG 盒提供与靶基因 DNA 的结合位点, TA 域则发挥转录激活功能, 它们的保守性和完整性对正常基因功能至关重要^[3, 4]。

除了调控骨骼系统发育之外, *SOX9* 基因还参与胚胎性别分化过程^[10]。通常人类性别可在细胞遗传学上以有无 Y 染色体来区分, 即正常有 Y 染色体者发育为男性, 否则发育为女性。但在人群中也存在罕见的性反转 (sex reversal) 现象, 如 46, XY 女性和 46, XX 男性。前者有 Y 染色体, 但无睾丸发育, 反而有卵巢及女性外生殖器官形成; 46, XX 男性则为女性核型和男性外生殖器官^[11]。性别决定的核心内容是决定睾丸形成, 而 Y 染色体上载有所谓睾丸决定因子 (testis-determining factor, TDF)。1990 年 Sinclair 等^[12] 克隆的 *SRY* (sex-determining region on Y) 基因被认为是 TDF 的最佳候选者。但 *SRY* 并非决定性别的唯一基因, 有多种不同基因在性别决定与分化过程中有序协同作用^[11, 13]。在现行以 *SRY* 为核心的基因-激素性别决定网络机制中, 一般认为, *SRY* 基因触发睾丸特异性 Sertoli 细胞分化, 接着 *SOX9* 基因表达上调, 它可能参与 Sertoli 细胞分化的起始

和维持, 故其突变可影响正常睾丸形成, 导致具有 *SRY* 基因或 46, XY 核型个体发育女性表型^[10, 11, 14]。这是 *SOX9* 基因突变在导致 CD 综合症的同时引发 46, XY 女性性反转的根本原因。

本例虽然我们已无法获得用于核型分析的材料, 但通过 PCR 从胎儿基因组扩增检测到男性特异性 *SRY* 基因片段, 间接提示其男→女性性反转的发生。总之, 基因扩增及突变分析证据表明该病例为 CD 综合症合并女性性反转, *SOX9* 基因 R178L(G→T) 突变可能是引发胎儿脊柱裂、脑积水、肾缺如、双足内翻等多种骨骼内外发育畸形以及 *SRY* 基因与女性表型矛盾的共同原因。这是中国人群中首次报道 *SOX9* 基因突变及其引发 CD 综合症合并女性性反转。

参考文献 (References)

- [1] WAGNER T, WIRTH J, MEYER J, *et al.* Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the *SRY*-related gene *SOX9*[J]. *Cell*, 1994, 79(6): 1111-1120.
- [2] PREISS S, ARGENTARO A, CLARYTON A, *et al.* Compound effects of point mutations causing campomelic dysplasia/autosomal sex reversal upon *SOX9* structure, nuclear transport, DNA binding, and transcriptional activation[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(30): 27864-27872.
- [3] STOKES D G, LIU G, DHARMAVARAM R, *et al.* Regulation of type-II collagen gene expression during human chondrocyte de-differentiation and recovery of chondrocyte-specific phenotype in culture involves Sry-type high-mobility-group box (*SOX*) transcription factors[J]. *Biochem J*, 2001, 360(2): 461-470.
- [4] SOCK E, PAGON RA, KEYMOLEN K, *et al.* Loss of DNA-dependent dimerization of the transcription factor *SOX9* as a cause for campomelic dysplasia[J]. *Hum Mol Genet*, 2003, 12(12): 1439-1447.
- [5] KYPRIOTON M, FOSSARD-DEMOOR M, CHADJICHRISTOS C, *et al.* *SOX9* exerts a bifunctional effect on type II collagen gene (*COL2A1*) expression in chondrocytes depending on the differentiation state[J]. *DNA Cell Biol*, 2003, 22(2): 119-129.
- [6] AKIYAMA H, CHABOISSIER M C, MARTIN J F, *et al.* The transcription factor *Sox9* has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of *Sox5* and *Sox6*[J]. *GenesDev*, 2002, 16(21): 2813-2828.
- [7] LEFEBVRE V, HUANG W, HARLEY V R, *et al.* *SOX9* is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro $\alpha 1$ (II) collagen gene[J]. *Mol Cell Biol*, 1997, 17(4): 2336-2346.

- [8] ZHOU G, LEFEBVRE V, ZHANG Z, *et al.* Three high mobility group-like sequences within a 48-base pair enhancer of the Col2a1 gene are required for cartilage-specific expression in vivo[J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(24): 14989-14997.
- [9] SEKIYA I, TSUJI K, KOOPMAN P, *et al.* SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(15): 10738-10744.
- [10] KNOWER K C, KELLY S, HARLEY V R. Turning on the male--SRY, SOX9 and sex determination in mammals[J]. *Cytogenet Genome Res*, 2003, 101(3-4): 185-98.
- [11] GRAVES J A. Evolution of the mammalian Y chromosome and sex-determining genes[J]. *J Exp Zool*, 1998, 281(5): 472-481.
- [12] SINCLAIR A H, BERTA P, PALMER M S, *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(6281): 240-244.
- [13] PATEL M, DORMAN K S, ZHANG Y H, *et al.* Primate DAX1, SRY, and SOX9: evolutionary stratification of sex-determination pathway[J]. *Am J Hum Genet*, 2001, 68(1): 275-280.
- [14] HARLEY V R, CLARKSON M J, ARGENTARO A. The molecular action and regulation of the testis-determining factors, SRY (sex-determining region on the Y chromosome) and SOX9 [SRY-related high-mobility group (HMG) box 9][J]. *Endocr Rev*, 2003, 24(4): 466-487.

· 简 讯 ·

《生命科学研究》进展与综述专辑 征 稿 启 事

21 世纪是生命科学的世纪。生命科学研究将是人类下一个世纪的主要实践活动。《生命科学研究》是经国家新闻出版署和国家科委批准,面向全世界公开发行的反映国内外生命科学领域中最新研究成果的综合性学术期刊。

《生命科学研究》由国内外著名的专家、学者 50 人组成编辑委员会,其中国内编委 39 人,国外编委 11 人,分布在美、英、日、瑞典等国家。由国内著名专家邹承鲁、袁隆平、戚正武、刘以训、顾孝诚、翟中和、刘筠、姚开泰、姚守拙、尹长民、刘德富教授担任学术顾问。

本刊拟于 2004 年下半年出版一期增刊《生命科学研究进展专辑》,主要刊登生物学、农业科学、基础医学等学科最新研究进展,特别欢迎反映各学科国内外最新研究动态的综述类文章。专辑的编排格式、印刷质量均与正刊保持一致。作者来稿请按现行国家标准或行业标准及本刊规范格式(参照《生命科学研究》征稿征订启事)撰写,并打印于 A4 纸上,一式两份,另请附上作者的详细通讯地址、联系电话和 E-mail 地址,信封上需注明“专辑论文”字样。

编辑部地址 410081 湖南师范大学生命科学学院内

电话 (0731) 8872616

E-mail sky@mail.hunnu.edu.cn smky6688@yahoo.com.cn

欢迎从事生命科学研究的广大读者赐稿! 欢迎订阅《生命科学研究》杂志!