

否还存在其他导致 S 伪影的因素,如 CT 衰减校正后在膈肌上下区域的图像数据处理存在固有缺陷,还不得而知,需要进一步探索。S 伪影导致肺底部的放射性缺损,严重低估局部 SUV,本研究中 S 伪影处肺组织的 SUV_{max} 和 SUV_{mean} 较同侧无伪影处肺组织下降达 55% 和 60%。伪影造成的测量 SUV 值下降,会导致疾病的错误分期,影响疗效评估。已有多篇文献报道在 CT 采集时进行呼吸控制可有效减少 S 伪影,提高图像质量^[6]。常采用的模式是呼气末屏气、呼气或吸气中期屏气。在人的呼吸周期中,呼气相的时间长于吸气相,最终得到的 PET 图像是处于呼气相的状态,因此,CT 扫描时采用呼气末或呼吸中期屏气的模式应该更接近于 PET 图像;若在 CT 扫描时采用深吸气末屏气则伪影最为严重^[7]。De Juan 等的研究表明,采用呼气末屏气的模式可使伪影的出现率降低 45%。Gilman 等^[6]通过比较 5 种不同的 CT 采集呼吸模式(呼气末屏气、吸气或呼气中期屏气、小口吸气屏气、深吸气末屏气以及平静呼吸)的图像质量,发现呼气末屏气及中期屏气时图像匹配程度最好。但国外也有文献报道部分患者由于不能长时间屏气从而造成更严重的伪影。并且这种方法也存在一定的弊端,即下肺部不能很好地膨胀,不易分辨一些小病灶,若加扫吸气末屏气 CT 又会增加患者的受照射剂量。除此种方法之外,呼吸门控技术、呼吸平均 CT 及 4D PET/CT 等方法也用来减少 S 伪影的发生^[8,9]。但是,由于导致 S 伪影的总体原理尚未完全清楚,这些解决措施均只能减少 S 伪影的发生,却无法根除 S 伪影。

综上所述,S 伪影在常规的 PET/CT 工作中较为常见,表现形式为膈肌与肺交界处的条带状放射性减

低或缺损区。了解它的分布规律及特征表现对日常工作中 PET/CT 图像的分析与理解有较大帮助,尤其是对于那些膈肌附近有病变的患者。虽然部分 S 伪影的产生原因尚不清楚,但是,对于已知导致 S 伪影发生率增高因素,应该采取相应措施,尽可能减少 S 伪影的发生及其对诊断、治疗的影响。

参考文献

- 1 Sureshbabu W, Mawlawi O. PET/CT imaging artifacts [J]. J Nucl Med Technol, 2005, 33(3): 156 - 161
- 2 Li TR, Tian JH, Wang H, *et al.* Pitfalls in positron emission tomography/computed imaging: causes and their classifications [J]. Chin Med Sci J, 2009, 24(1): 12 - 19
- 3 Nehmeh SA, Erdi YE. Respiratory motion in positron emission tomography/computed tomography: a review [J]. Semin Nucl Med, 2008, 38(1): 167 - 176
- 4 Dawood M, Buther F, Jiang X, *et al.* Respiratory motion correction in 3 - D PET data with advanced optical flow algorithms [J]. IEEE Transactions on Medical Imaging, 2008, 27(8): 1164 - 1175
- 5 许全盛, 袁克虹, 于丽娟, 等. PET/CT 图像呼吸运动伪影校正研究进展 [J]. 中国生物医学工程学报, 2009, 28(4): 573 - 580
- 6 Gilman MD, Fischman AJ, Krishnasetty V, *et al.* Optimal CT breathing protocol for combined thoracic PET/CT [J]. AJR, 2006, 187(5): 1357 - 1360
- 7 Blodgett TM, Mehta AS, Mehta AS, *et al.* PET/CT artifacts [J]. Clinical Imaging, 2011, 35(1): 49 - 63
- 8 Pan T, Mawlawi O, Nehmeh SA, *et al.* Attenuation correction of PET images with respiration - averaged CT images in PET/CT [J]. J Nucl Med, 2005, 46(9): 1481 - 1487
- 9 Killoran JH, Gerbaudo VH, Mamede M, *et al.* Motion artifacts occurring at the lung/diaphragm interface using 4D CT attenuation correction of 4D PET scans [J]. J Appl Clin Med Phys, 2011, 12(4): 3502 - 3510

(收稿日期:2012-09-27)

(修回日期:2012-10-18)

46,XY 女性性逆转患者的 NR5A1 基因突变分析

陈雪娇 许惠惠 潘映秋 戴美珍 范历龙 章 鸯

摘 要 目的 分析 XY 女性性逆转患者核受体亚家族 5, 组 A, 成员 1 (nuclear receptor subfamily 5 group A member 1, NR5A1) 基因的基因突变情况。方法 抽提样本外周血白细胞的 DNA, 对 NR5A1 的 2 ~ 7 外显子进行 PCR 扩增, 扩增产物直接测序, 重复实验和克隆测序实验验证检测到的突变, 酶切分析筛查 110 名正常人群排除突变的的多态性。结果 在 5 例样本中未检出明显异常的突变, 只在样本 4 中检出 1 个多态突变 (p. G146A), 该突变在正常对照人群中检出了 37.3% 的突变率。结论

基金项目:浙江省台州市科技计划项目(100KY09);恩泽医疗中心(集团)科学研究基金资助项目(2010)

作者单位:317000 浙江省台州医院中心实验室

尽管在本研究中只检出 1 个基因多态突变,但结合国外报道,NR5A1 的基因突变和性逆转的发生还是存在相关性。

关键词 性逆转 NR5A1 基因 SF-1 基因 基因突变

Mutation Analysis of Nuclear Receptor Subfamily 5 Group A Member 1 in 46, XY Female Sex Reversal. Chen Xuejiao, Xu Huihui, Pan Yingqiu, Dai Meizhen, Fan Lilong, Zhang Yang. Center Lab of Taizhou Hospital, Zhejiang 317000, China

Abstract Objective To investigate the mutations in NR5A1 leading to 46,XY female sex reversal. **Methods** Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes and exons 2-7 of the gene encoding SF-1 (NR5A1) were PCR-amplified. And direct sequencing was carried out to detect the mutation. Clone sequencing and repeated trial was applied to detect the results of DNA sequencing. Mutation was screened in 110 normal individuals who were unrelated persons with normal phenotypes to exclude the possibility of polymorphism by restriction enzyme digestion. **Results** We did not observe the mutation in 5 cases except a polymorphic mutation of p. G146A in exon4 in patient 4. p. G146A in normal individuals was detected in 37.3% mutation rate. **Conclusion** Although we only detect a polymorphic mutation, there are so many other reports that NR5A1 mutations is a relatively frequent cause of 46,XY DSD in humans.

Key words Sex reversal; NR5A1 gene; SF-1 gene; Gene mutation

性逆转综合征是一种由于性别决定和分化异常导致的两性畸形,其主要特征是患者的染色体核型与临床表型相反,包括 46,XX 男性和 46,XY 女性,46,XY 女性性逆转综合征的发病率约为 1/10 万,目前临床相关检查的分子水平项目只有 SRY 检测,而且只有 10%~15% 能检测到异常,即还存在很多别的基因突变^[1-3]。NR5A1 是一个调节肾上腺、性腺、类固醇合成、生殖及其他代谢功能的核受体,是一个关键的转录调节基因。国际上对该基因已有一定的研究,

国内未见任何和性逆转相关的报道,本实验通过测序检测该基因的基因突变情况来研究 46,XY 女性性逆转患者与 NR5A1 的相关性。

对象与方法

1. 对象:2007 年 1 月~2012 年 2 月到笔者医院就诊的临床表型为女性染色体检查为 46,XY 的患者 5 例,年龄 14~29 岁,已取得所有患者的知情同意。具体临床资料详见表 1。对照为 110 名表型和核型一致的体检人群。

表 1 5 例 46,XY 性逆转综合征患者的临床资料

患者	性别	年龄	核型	临床表现	检查结果
1	女性	29 岁	46, XY	原发闭经,乳房发育不良,无阴毛,阴道 4cm 左右。幼时曾行斜疝手术,父母表兄妹结婚,有一弟正常	盆腔内未扫及子宫\附件,腹股沟未见睾丸、附睾图像
2	女性	14 岁	46, XY/ 45,X ^[4]	矮小症,身高 119.5cm,体重 22kg,脸上、小腿色素痣明显,左上睑下垂,出生时体重 1.00kg	子宫未发育
3	女性	18 岁	46, XY	身高 170cm,原发性闭经	子宫偏小
4	女性	24 岁	46, XY	身高 140cm,原发性闭经,腋毛无,乳房发育可,子宫偏小,服药后可有月经,阴毛有,稀,阴道可,宫颈小,双胞胎(弟 170cm)	子宫:29mm×16mm×14mm,子宫前位,内膜厚约 4mm,左右侧卵巢显示不清,示子宫先天性不良。 X 线示两手低 3~5 掌骨、两足第 4 跖骨变短,骨盆平片未见异常 X 线改变
5	女性	23 岁	46, XY	原发性闭经,外阴发育正常	子宫缺如,盆腔左侧液性混浊肿块

2. 方法:(1)DNA 制备:用捷瑞公司提供的血液基因组 DNA 提取试剂盒提取白细胞基因组 DNA。(2)引物设计与合成:NR5A1 的 PCR 引物从外显子 2~7 的 7 对引物依次为: Exon2, F2:5'-GGGCACAGAGAGGGGATTAC-3'; R2:5'-CTCGGGAGCTGAGAGTC-3'; Exon3, F3:5'-ATTCGTACGACGAGGACCTG-3'; R3:5'-CGAAGGCCAATGGTACTATCC-3'; Exon4amplicon1, F4:5'-GTGTTGACAGGGGAGAGAG-3'; R4:5'

-AGAGAAGGGCTCTGGGTAGC-3'; Exon4amplicon2, F4a:5'-TCTGAGTACCCGGAGCCTTA-3'; R4a:5'-AAGGATGGCCCTATC-CAAAG-3'; Exon5, F5:5'-ATCTGGGTAGATGGGCACAG-3'; R5:5'-GTGGGGAAAGGGCTGATAAT-3'; Exon6, F6:5'-TCTGACCTGCACCTCCAATC-3'; R6:5'-CTCTGGCTGTCTCCACCTCT-3'; Exon7, F7:5'-ATGCCCATCTCTTTGATGGT-3'; R7:5'-GGTGGGCATCAGAAAATGAA-3',相应的 PCR 片段大小分别为:

304,349,520,381,395,301,475bp,PCR 引物由上海捷瑞公司合成。(3)PCR 扩增:50μl PCR 反应体系。PCR 反应条件:预变性 95℃ × 5min,变性 95℃ × 30s,退火 60℃ (Exon4amp2、Exon2、Exon5 退火 60℃,Exon3 退火 62℃,Exon4amp1、Exon6、Exon7 退火 64℃) × 30s,延伸 72℃ × 30s,扩增 30 ~ 35 个循环后再 72℃ 延伸 5min。通过 1% 琼脂糖凝胶电泳 (150V × 30min) 检测 PCR 扩增产物的特异性。(4)测序分析:将上述 PCR 纯化产物用 BigDye Terminator 和 original v3.1 测序试剂盒在 ABI3730 测序仪上进行测序分析。(5)连接质粒:试剂盒为 Fermentas #K1231,操作按说明书进行。(6)限制性内切酶分析 (20μl 体系):10 × Buffer B 2μl, Sph I (Pae I) 1μl, PCR 产物 10μl, H₂O 7μl, 37℃ 水浴 2h。

结 果

5 例患者的性激素系列结果见表 2。经 6 个外显子的全序列测序后在样本 4 的外显子 4 中发现 1 个多态突变位点 p. G146A。根据 p. G146A 的突变我们设计了 Sph I (Pae I) 酶对对照人群进行了相应的限制性内切酶酶切筛查。在对照人群中检出该突变发生率为 37.3%。该位点突变后的测序图、突变后酶切分析电泳图,分别见图 1、图 2。

表 2 5 例 46, XY 女性性逆转患者的性激素及皮质醇检查结果

患者	PRL (ng/ml)	FSH (mIU/ml)	LH (mIU/ml)	E ₂ (pg/ml)	T (ng/ml)	P (μg/dl)
1	9.2	159.3	41.4	26.0	0.48	1.2
2	12.1	100.5	20.6	9.0	0.00	8.6
3	5.8	62.6	15.4	20.3	0.29	7.3
4	12.6	119	25.4	18.7	0.63	10.1
5	5.9	10.7	29.1	52	3.0	8.2

PRL 的正常值: 女性为 5.18 ~ 26.53ng/ml, 男性为 3.46 ~ 19.40ng/ml; FSH 的正常值: 女性卵泡期、排卵期、黄体期、绝经期分别为 3.03 ~ 8.08, 2.55 ~ 16.69, 1.38 ~ 5.47, 26.72 ~ 133.41mIU/ml, 男性为 0.95 ~ 11.95mIU/ml; LH 的正常值: 女性卵泡期、排卵期、黄体期、绝经期分别为 2.39 ~ 6.60, 9.06 ~ 74.24, 10.90 ~ 9.23, 10.39 ~ 64.57mIU/ml, 男性为 1.14 ~ 8.75 mIU/ml。E₂ 的正常值: 女性卵泡期、排卵期、黄体期、绝经期分别为 21 ~ 251, 38 ~ 469, 21 ~ 312, <10 ~ 28pg/ml 男性为 11 ~ 14pg/ml; T 的正常值: 女性为 0.13 ~ 1.08ng/ml, 男性为 1.66 ~ 8.11ng/ml。P 的正常值为 3 ~ 15μg/dl

讨 论

编码 NR5A1 的老鼠基因因其类似果蝇孤儿核受体 (FTZ-F1) 最早被称为 FtzF1, 这个基因位于老鼠的 2 号染色体^[5]。相应的编码 NR5A1 的人类基因也命名为 FtzF1, 又名 I 型类固醇生成因子 (steroidogenic factor 1, SF-1), 位于 9q33.3, 参照 NM_004959.4, NR5A1 的 DNA 全长 33185bp, 含有 7 个外显子, 第 1

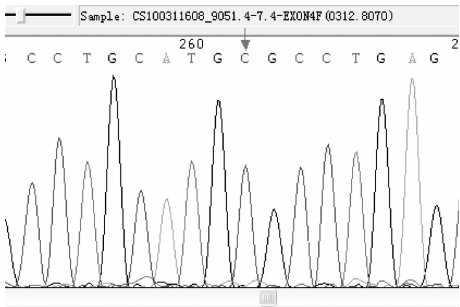


图 1 样本 4 的 Exon4amp1 中发现的 p. G146A 的测序峰图

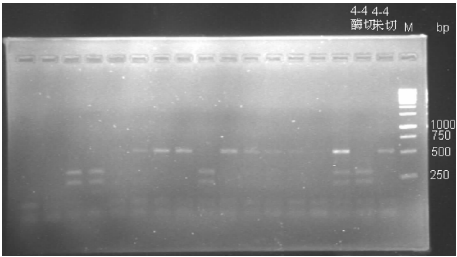


图 2 p. G146A 突变的 Sph I 酶酶切后电泳图

阳性结果能切下 303bp 和 217bp 两个片段。右 1 为 1kb Marker, 右 2 为未酶切样本 4 的 Exon4amp1PCR 扩增产物, 右 3 为样本 4 的 Exon4amp1PCR 扩增产物酶切后的片段, 右 4 为对照样本的杂合突变, 右 10、15、16 为对照样本的纯合突变

个外显子无翻译功能, mRNA 含 3095bp。人类 NR5A1 的突变最早是在合并有肾上腺功能不全的两例 46, XY 女性性腺发育不全患者中鉴定的, 该患者的 NR5A1 发生了位于 DNA 结合域的第 1 个锌指结构内的 P 盒的 p. G35E 突变, P 盒的氨基酸序列是决定核受体 DNA 结合特异性和 DNA 大沟接口的主要因素, 因而该突变严重影响了 NR5A1 的功能^[6]。在随后的 46, XY 性腺发育不全患者研究中, 人们又相继发现了人类的 NR5A1 基因的 31 处突变, 具体的突变有: p. G35E、p. M78I、p. V15M、p. C91S、p. C16X、c. 18delC、c. 1058_1065del、p. C33S、p. R84H、p. Y138X、c. 536delC、c. 1277dupT、p. L437Q、p. V355M、p. V41G、c. 666delC、c. 3G → A、c. 319^c > T、c. 390delG、c. 424_427dupCCCA、p. G146A、c. 103 - 3C > A/WT、c. 31G > T、c. 1A > G (p. Met1Val)、c. 116G > C (p. Arg39Pro)、c. 151delG、c. 369insC、c. 1138G > T (p. Asp380Tyr)、p. R84C、p. R92Q、c. 877G → A^[6-14]。截至目前, NR5A1 在低睾酮 XY 性逆转患者的突变检出率接近 33%, 且多数存在家系遗传, 这些突变在各外显子均有分布, 但更集中于外显子 2、3、4 上, 外显子 5、6、7 较少发生突变, 在本研究的实验过程中曾检测

到外显子 5 的 c1113A > G 突变,外显子 4 的 c. 437G > C 突变和 p. V128A 突变,该 3 处突变经再次 PCR 和连接质粒后的测序检测未发现相同的突变,因此考虑为实验因素造成的随机突变^[4]。

在 Diana 等的研究中,他们还发现 NR5A1 和卵巢发育及功能的损伤相关,提出 NR5A1 的突变和卵巢生殖能力的逐步丧失有关,且具有不完全显性。在本研究中,患者 4 的 DNA 检测到 NR5A1 的 p. G146A 突变,p. G146A 突变经限制性内切酶分析在对照人群中检出了 37.3% 的突变率,属于多态突变,刘伟等做过功能分析发现该位点突变后将导致 NR5A1 的转录活性下降 25%。XY 女性性逆转患者由于性腺发育不全,往往表现原发闭经和不育。Miroslav 等则报道了 1 例罕见的 46, XY 女性性腺发育不全患者生育了 1 个 46, XY 性腺发育不全的女儿。这是首次报道 46, XY 女性性逆转患者生育小孩,该患者的外周血核型为 46, XY,皮肤纤维细胞核型为 80% 46, XY/20% 45, X,卵巢细胞核型则为 93% 46, XY/6% 45, X。在他们的家系调查中发现多例模糊的外生殖器和不育患儿(表型男性、女性都有),对患者及其女儿的基因(SOX9、SF1、DMRT1、DMRT3、TSPYL、BPES1、DHH、WNT4、SRY 和 DAX1)测序分析,未发现有关突变。提示可能存在新的性别决定基因或某一能够导致染色体嵌合的基因。70% ~ 80% 的 46, XY 性逆转患者的分子基础至今还尚不明,因为他们都含有正常的目前已知的性别相关决定基因,因而现在除了测序分析候选基因外,人们使用各种检测技术在性逆转中筛查新的相关基因,再通过老鼠的基因敲除实验证实。如 Singh 等通过对多个性逆转患者的家系的全基因组扫描寻找性逆转原因不明患者的染色体位点,最后发现在 X 染色体短臂上含有展开来约 3.41cM (75.79 ~ 79.20cM) 的两个标志器[DXS991 (Xp11.21) 和 DXS1039 (Xp11.23 - Xp11.22)] 的 LOD 得分最高。Vinci 等用高分辨微阵列比较基因组方法检测合并自闭症的 46, XY 性腺发育不全患者,发现含 DMRT1 和 DMRT3 的 9p24 缺失。

总之,尽管在本实验中只检测到一个多态突变,但 NR5A1 作为下丘脑-脑下垂体-生成类固醇轴相关的关键转录调节基因,在性分化和性腺发育中起到了很重要的作用,遗传分析更多样本的 NR5A1 的基因突变和表达活性的改变对了解性别决定机制是非常有意义的。进一步的 NR5A1 信号途径的调节机制的研究将为性分化障碍和不育患者的诊断和治疗开

启一扇新的大门。但若需要彻底明确 46, XY 女性性逆转的发生机制,还要经过不断的探索研究。

参考文献

- 1 蒋三亮,张思仲,杨军. 性反转综合症患者的分子病因学研究[J]. 中华医学遗传学杂志, 1993, 1:18
- 2 Shahid M, Dhillon VS, Jain N, *et al.* Two new novel point mutations localized upstream and ownstream of the HMG box region of the SRY gene in three Indian 46, XY females with sex reversal and gonadal tumour formation[J]. Mol Hum Reprod, 2004, 10(7):521-526
- 3 Cameron FJ, Sinclair AH. Mutations in SRY and SOX9: testis - determining genes[J]. Hum Mutat, 1997, 9(5):388-395
- 4 Pascal P, Elodie L, Delphine Z, *et al.* Steroidogenic factor - 1 (SF - 1) gene mutation as a frequent cause of primary amenorrhea in 46, XY female adolescents with low testosterone concentration[J]. Reproductive Biology and Endocrinology, 2010, 8:28
- 5 Taketo M, Parker KL, Howard TA, *et al.* Homologs of *Drosophila* Fushi - Tarazu factor 1 map to mouse chromosome 2 and human chromosome 9q33[J]. Genomics, 1995, 25(2):565-567
- 6 Achermann JC, Ito M, Ito M, *et al.* A mutation in the gene encoding steroidogenic factor - 1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans[J]. Nat Genet, 1999, 22(2):125-126
- 7 Mallet D, Bretones P, Michel - Calemard L, *et al.* Gonadal dysgenesis without adrenal insufficiency in a 46, XY patient heterozygous for the nonsense C16X mutation: a case of SF1 aplousufficiency[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(10):4829-4832
- 8 Lin L, Philibert P, FerrazdeSouza B, *et al.* Heterozygous missense mutations in steroidogenic factor 1 (SF1/Ad4BP, NR5A1) are associated with 46, XY disorders of sex development with normal adrenal function[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2007, 92(3):991-999
- 9 Kohler B, Lin L, Ferraz de Souza B, *et al.* Five novel mutations in steroidogenic factor 1 (SF1, NR5A1) in 46, XY patients with severe underandrogenization but without adrenal insufficiency[J]. Hum Mutat, 2008, 29(1):59-64
- 10 Reuter AL, Goji K, Bingham NC, *et al.* A novel mutation in the accessory DNA - binding domain of human steroidogenic factor 1 causes XY gonadal dysgenesis without adrenal insufficiency[J]. Eur J Endocrinol, 2007, 157(2):233-238
- 11 Pascal P, Delphine Z, Lin L, *et al.* Mutational analysis of steroidogenic factor 1 (NR5A1) in 24 boys with bilateral anorchia: a French collaborative study[J]. Human Reproduction, 2007, 22(12):3255-3261
- 12 Correa RV, Domenice S, Bingham NC, *et al.* A microdeletion in the ligand binding domain of human steroidogenic factor 1 causes XY sex reversal without adrenal insufficiency[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(4):1767-1772
- 13 Birgit K, Lin L, FerrazdeSouza B. Five novel mutations in steroidogenic factor 1 SF1, NR5A1 in 46, XY patients with severe underandrogenization but without adrenal insufficiency [J]. Hum Mutat, 2008, 29(1):59-64
- 14 Toshihiro T, Fumie F, Kenji F. A novel heterozygous mutation of steroidogenic factor1 (SF 1Ad4BP) gene (NR5A1) in a 46 XY disorders of sex development (DSD) patient without adrenal failure[J]. Endocrine Journal, 2009, 56(4):619-624

(收稿日期:2012-09-09)

(修回日期:2012-09-26)