

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.23.021

## 400 例性发育异常患者遗传学病因检测与特征分析\*

孙夏瑜,武坚锐,卢洪涌,叶婷,郭荣,孙畅,薛慧琴<sup>△</sup>

山西省儿童医院/山西省妇幼保健院产前诊断中心细胞遗传室,山西太原 030013

**摘要:**目的 应用多种遗传学技术检测诊断 400 例性发育异常(DSD)患者的遗传学病因,并总结分析其临床特征。方法 选取 2018 年 1 月至 2023 年 3 月该院收治的 400 例确诊为 DSD 的患者作为研究对象,运用 G-显带染色体核型分析、荧光原位杂交(FISH)、多重链接探针扩增技术(MLPA)、高通量测序的低深度全基因组测序(CNV-seq)、全外显子组测序技术(WES)、全基因组测序(WGS)等技术进行检测和定位,查找患者遗传学病因。结果 经 G-显带染色体核型分析,以及 FISH、MLPA 对核型分析结果进行验证,明确诊断 45,X 特纳综合征及其变异型 136 例(34.00%),47,XXY 克氏综合征及其变异型 187 例(46.75%);经 G-显带染色体核型分析、CNV-seq、WES、WGS、一代测序技术诊断 46,XX DSD 17 例(4.25%)、46,XY DSD 35 例(8.75%);经 G-显带染色体核型分析和 FISH、MLPA 验证诊断性染色体核型异常 DSD 25 例(6.25%)。结论 联合应用 G-显带染色体核型、FISH、CNV-seq、WES 等多种遗传学方法,能准确发现 DSD 的遗传学病因,建立基因型与表现型之间良好关系。

**关键词:**性发育异常; 遗传学病因; G-显带染色体核型分析; 低深度全基因组测序; 全外显子组测序技术

中图法分类号:R596

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2024)23-3537-04

**Genetic etiology testing and characteristic analysis of 400 patients with disorder sexual development\***SUN Xiayu, WU Jianrui, LU Hongyong, YE Ting, GUO Rong, SUN Chang, XUE Huiqin<sup>△</sup>

Prenatal Diagnosis Center Cytogenetics Laboratory, Children's Hospital of Shanxi/Women Health Center of Shanxi, Taiyuan, Shanxi 030013, China

**Abstract: Objective** To detect and diagnose the genetic etiology of 400 patients with disorder of sex development (DSD) by various genetic techniques, and summarize and analyze their clinical characteristics. **Methods** Four hundred patients diagnosed with DSD in the hospital from January 2018 to March 2023 were selected as research objects, and G-banding chromosome karyotype analysis, fluorescence in situ hybridization (FISH), multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), copy number variation sequencing (CNV-seq) with high-throughput sequencing, whole exome sequencing (WES), whole genome sequencing (WGS) and other techniques were adopted to detect and locate the genetic causes of the patients. **Results** After G-banding chromosomal karyotype analysis and verification of the results by FISH and MLPA, 136 cases (34.00%) of 45,X Turner syndrome and its variants were diagnosed definitely, as well as 187 cases (46.75%) of 47,XXY Klinefelter syndrome and its variants. After G-banding chromosomal karyotype analysis, CNV-seq, WES, WGS and first-generation sequencing technology, 17 cases (4.25%) of 46,XX DSD and 35 cases (8.75%) of 46,XY DSD were diagnosed. After G-banding chromosomal karyotype analysis and verification by FISH and MLPA, 25 cases (6.25%) of diagnostic chromosomal karyotype abnormalities were diagnosed. **Conclusion** Combination of multiple genetic methods such as G-banded chromosome karyotype, FISH, CNV-seq and WES is possible to accurately identify the genetic causes of DSD and establish a good relationship between genotype and phenotype.

**Key words:** disorder of sexual development; genetic etiology; G-banding chromosome karyotype analysis; copy number variation sequencing; whole genome sequencing

\* 基金项目:山西省卫生健康委员会科研课题计划(2022116)。

作者简介:孙夏瑜,女,副主任技师,主要从事细胞遗传、遗传病诊断、产前诊断、性别发育异常、遗传学实验室技术方向的研究。

<sup>△</sup> 通信作者, E-mail: fruitsunrain@163.com。

性发育异常(DSD)是以性腺、性染色体、性激素异常为主要表现的一种先天性遗传,发生率为新生儿的1/5 000~1/4 500,若考虑所有生殖器官的先天性异常,其发病率可为1/300~1/200,总体并不罕见<sup>[1-2]</sup>。当一个家庭诞生一位性别难辨的新生儿,可使整个家庭陷入焦虑、紧张及痛苦中,迫切希望能尽快确认性别,并得到正确的治疗。DSD从新生婴幼儿到成年不同年龄段,可能经历儿科—妇科/泌尿外科—内分泌科等多个科室的诊治,特别是青春期的变化给患者带来极大的精神心理压力,所以早期明确DSD病因,做出正确的性别预判,对后续长期合理的养育、治疗、生活等均具有重要意义<sup>[3]</sup>。DSD不同个体的表现具有高度异质性,病因非常复杂,大多与基因突变有关,因此基因遗传学检测对DSD的诊断至关重要<sup>[4]</sup>。G-显带染色体核型分析、荧光原位杂交(FISH)、多重链接探针扩增技术(MLPA)等是DSD传统的遗传学诊断技术,诊断单纯的性染色体异常型DSD方便快捷,但在部分DSD分型中应用受限,候选基因Sanger测序是早期的分子诊断技术,费时耗力,且诊断率低<sup>[5-6]</sup>。高通量测序的低深度全基因组测序(CNV-seq)、全外显子组测序技术(WES)、全基因组测序(WGS)等是近年来分子遗传学新兴技术,可对未知的基因突变进行检测,提高对DSD致病性基因的检出率<sup>[7-8]</sup>。本研究联合应用多种遗传学技术对DSD遗传学病因进行检测诊断和定位。现报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取2018年1月至2023年3月本院收治的400例确诊为DSD的患者作为研究对象,其中社会学性别女178例,男222例;年龄0~44岁,平均(15.86±5.03)岁,所有患者均为产后诊断,251例主诉产前未进行过DSD相关检查,149例对是否进行产前DSD相关检查不明。纳入标准:参考相关共识<sup>[9]</sup>,结合外生殖器的表现型、病史、家族史、体格检查、内分泌实验室、遗传学实验室和影像学检查确诊;年龄0~44岁。排除标准:伴有危及生命的急性疾病。本研究所有患者的监护人充分知晓研究内容并签署知情同意书。该研究获得本院医学伦理委员会审批通过(批号:IKB-KYYN-2022-002)。

### 1.2 方法

**1.2.1 体格检查** 包括身高、第一性征、第二性征发育情况(乳房、外阴、腋毛等),必要时进行病理检查。

**1.2.2 影像学检查** 包括性腺、盆腔和腹股沟彩超、MRI、CT。

**1.2.3 血清性激素测定** 包括雌二醇、孕酮、促卵泡激素、黄体生成素、睾酮、泌乳素、促肾上腺皮质激素、皮质醇8:00、皮质醇16:00、皮质醇24:00,采用化学发光法检测各指标,范围参考检测说明书。以上检查均根据患者病情,并结合自身意愿选择性检测。

**1.2.4 遗传学检测** 用EDTA抗凝管采集患者及其

父母静脉血5 mL,4℃冷藏,72 h以内运至实验室进行检测。

本研究所涉及遗传学技术的主要特点及作用如下:G-显带染色体核型分析能观察染色体形态学的异常,还能看染色体易位倒位等结构异常,理论上可看到5M以上的异常;FISH、MLPA能对核型分析结果进行验证;CNV-seq、WES、WGS等能分析查找可能的致病基因,一代测序技术(Sanger测序)能验证并确定致病基因。

根据各遗传学技术的特点和作用,所有患者均行G-显带染色体核型分析,性染色体异常型以FISH、MLPA对核型分析结果进行验证,46,XX DSD、46,XY DSD以CNV-seq、WES、WGS等分析查找可能的致病基因,再利用一代测序技术(Sanger测序)验证并确定致病基因。CNV-seq检测内容:(1)全基因组23对染色体非整倍体;(2)>100 kb的致病性CNVs;(3)>10%的非整倍体嵌合;(4)联合STR检测三倍体等异倍体;WES检测项目为trio全外显子组测序检测;检测区域:人类基因组中约2万个基因的外显子区;方法学分为突变筛查(运用高通量测序技术)、基因数据分析(运用生物信息学及临床信息分析技术)和疑似致病突变验证(运用Sanger测序技术)3个主要步骤。

FISH试剂盒购自北京金菩嘉医疗科技有限公司;CNV-seq检测结果来源于青岛贝瑞和康医学检验实验室有限公司;全外显子组检测结果来源于北京智因东方转化医学研究中心有限公司。

**1.3 统计学处理** 采用SPSS27.0统计软件进行数据处理。计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 $\chi^2$ 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 DSD患者的遗传病因** 400例DSD患者均获得明确诊断,包括45,X特纳综合征及其变异型136例(34.00%)、47,XXY克氏综合征及其变异型187例(46.75%)、46,XX DSD 17例(4.25%)、46,XY DSD 35例(8.75%)、性染色体核型异常DSD 25例(6.25%)。45,X特纳综合征及其变异型、47,XXY克氏综合征及其变异型经G-显带染色体核型分析,以及FISH、MLPA对核型分析结果进行验证,明确诊断;46,XX DSD、46,XY DSD经G-显带染色体核型分析、CNV-seq、WES、WGS、用一代测序技术诊断;性染色体核型异常DSD经G-显带染色体核型分析和FISH、MLPA验证诊断。不同病因DSD患者的年龄分布见表1。

### 2.2 不同病因DSD患者的临床表现

**2.2.1 45,X特纳综合征及其变异型** 136例45,X特纳综合征及其变异型患者的社会学性别均为女性,年龄1~44岁,未成年就诊原因主要是身材矮小、生长迟缓,成人就诊原因主要是不孕、闭经。经G-显带

染色体核型分析,以及 FISH、MLPA 对核型分析结果进行验证,均获得明确诊断。

表 1 不同病因 DSD 患者的年龄分布(n)

类别	n	≤6 岁	>6~18 岁	>18 岁
45,X 特纳综合征及其变异型	136	18	63	55
47,XXY 克氏综合征及其变异型	187	3	8	176
46,XX DSD	17	11	0	6
46,XY DSD	35	11	20	4
性染色体核型异常 DSD	25	7	3	15

**2.2.2 47,XXY 克氏综合征及其变异型 187 例** 47,XXY 克氏综合征及其变异型患者的社会学性别均为男性,年龄新生儿至 42 岁,就诊原因主要是无精/少精、不育、生殖器小等。经 G-显带染色体核型分析,以及 FISH、MLPA 对核型分析结果进行验证,均获得明确诊断。

**2.2.3 46,XX DSD 检测结果 17 例** 46,XX DSD 患者的社会学性别均为男性,7 例在出生 14 h 至 27 d 就诊,就诊原因主要是两性畸形、无睾丸、尿道下裂等肉眼可见的异常表现;幼儿与低龄就诊的有 4 例,就诊原因主要是抽搐、发育全面落后;成年后就诊的有 6 例,就诊原因主要是无精子症、性功能异常等;患者性激素水平存在不同程度异常,经 G-显带染色体核型分析、CNV-seq、WES、WGS、一代测序技术检查均检测到遗传学病因。

**2.2.4 46,XY DSD 检测结果 35 例** 46,XY DSD 患者的社会学性别均为女性,3 例在出生 1 h 至 7 d 就诊,就诊原因主要有两性畸形、肛门闭锁等;幼儿与低龄就诊的有 8 例,就诊原因主要是外阴畸形、尿道下裂等;学龄至未成年期就诊 20 例,就诊原因主要有无阴道、闭经、两性畸形等;成年后就诊有 4 例,就诊原因主要是不孕、先天无子宫卵巢、原发性卵巢功能低下;患者性激素水平存在不同程度异常,34 例经 G-显带染色体核型分析、CNV-seq、WES、WGS、一代测序技术检查均检测到遗传学病因,1 例核型分析提示 46,XY,但拒绝进行后续的检查,染色体编号未明。

**2.2.5 性染色体核型异常 DSD 检测结果 25 例** 性染色体核型异常 DSD,社会学性别男性 18 例,女性 7 例;仅 10 例在婴儿、幼儿、低龄期就诊,15 例在成年后以无精、不育、矮小等原因就诊,患者性激素水平存在不同程度异常,25 例患者经 G-显带染色体核型分析和 FISH、MLPA 验证均发现遗传学病因。

### 3 讨论

**3.1 研究意义** 传统的细胞和分子遗传学方法对 DSD 的诊断率偏低,较大比例患者不能获得精确的分子遗传学诊断,严重影响患者性心理发展、性别选择及治疗方案的决策等,给患者及其家庭带来极大困扰<sup>[10-11]</sup>。国外相关报道显示,仅有约 1/3 的 DSD 患

者被确诊,50% 以上患者包含数百个未知意义的变异<sup>[12]</sup>。基因测序技术从第一代发展至第三代,尽管其通量、测序速度得到提高,但仍有部分患者未得到明确的基因变异诊断<sup>[13-14]</sup>。随着对 DSD 相关基因的认识加深和不断更新的检测技术,可能给 DSD 遗传学病因诊断带来新的发现,故建立一个准确的遗传学诊断路径具有重要意义。

**3.2 DSD 遗传学病因的诊断** 许传等<sup>[15]</sup>报道分析了 1 例罕见 47,XX,del(Y)(q11.2)/46,XX 嵌合型克氏征患者,指出 G-显带染色体核型分析不能充分发现低比例染色体嵌合的存在。甚至部分病例会出现 G-显带染色体核型分析未见嵌合,而 FISH 检测为嵌合,即 G-显带染色体核型和 FISH 结果不一致的情形,但患者已有明确 DSD 症状或高度怀疑为 DSD,提示常规检测手段具有一定局限性<sup>[16]</sup>。刘雪萌等<sup>[17]</sup>纳入 206 例 46,XY 性发育异常患者,运用多重聚合酶链反应(PCR)的 AA 芯片法和探针捕获法 2 种靶向二代测序法,51.94% 患者获得了明确的分子遗传学诊断,10.19% 患者基因突变不明。本研究通过不同的遗传学检测技术的特点,循序渐进地对不同类型的患者选择适合的检测技术进行病因学诊断研究,不仅可以发现目前报道的已知致病基因是否会有新的变异位点及新表型,同时还可能发现新的致病基因,并给出基因诊断,结合患者临床资料再进行基因型-表型的关联分析。结果显示,400 例 DSD 患者病因分别为 45,X 特纳综合征及其变异型、47,XXY 克氏综合征及其变异型、46,XX DSD、46,XY DSD、性染色体核型异常 DSD,均明确了遗传学病因。夏俊珂等<sup>[18]</sup>联合应用 FISH 和 CNV-seq 遗传学技术明确了 1 例结构异常染色体的性质,对特纳综合征做出了准确诊断,提示 FISH 联合 CNV-seq 遗传学技术在 DSD 遗传学病因诊断中具有一定价值。符芳等<sup>[19]</sup>应用 WES 对传统产前(G-显带染色体核型和/或染色体微阵列分析)诊断阴性的先天性发育异常胎儿家系进行遗传学病因检测,发现 WES 可额外提高 13.3% 的检出率,本研究观点与之相似。首先所有疑似 DSD 患者,先进行 G-显带染色体核型分析,性染色体异常型以 FISH、MLPA 对核型分析结果进行验证,46,XX DSD、46,XY DSD 以 CNV-seq、WES 等分析查找可能的致病基因,再利用一代测序技术(Sanger 测序)验证并确定致病基因,使 DSD 患者基因型与表现型之间建立了良好关系。

**3.3 DSD 的临床特征及辅助诊断** 明确 DSD 的诊断,需要结合外生殖器的表现型、病史、家族史、体格检查、内分泌实验室、遗传学实验室和影像学检查来综合评估<sup>[20-21]</sup>。不同类型的 DSD 患者临床表现不同,单纯的性染色体异常型 DSD 患者,比如特纳综合征及其亚型通常以矮小、第二性征不发育、原发闭经、妇科超声异常等原因就诊;克氏综合征及其亚型通常

以睾丸发育不良、小阴茎、不孕不育、无精或重度少弱精等原因就诊。46,XY 型 DSD 患儿常表现为不同程度的外生殖器男性化。46,XX 型 DSD 患者在子宫内经常表现出雄性激素暴露增加的迹象,从而导致生殖器外显型的男性化。结合患者母亲在怀孕期间的病史(男性化或使用孕激素等药物)、家族史、其他家庭成员表型是否提示相关的遗传模式。在性别认定过程中,遗传学实验室和内分泌实验室尤为重要,随着分子生物学技术和研究的进步,不断发现有新的致病基因参与性发育和分化,很多 DSD 患者都可通过传统遗传学诊断技术和新一代的基因检测进行病因诊断。值得一提的是,本研究还反映出一个现象,产前明确诊断较为鲜见,对孕妇进行 DSD 筛查及高风险人群进行进一步的有创检测是必要的,应加强宣教,提高 DSD 筛查认知和意识,促进人口质量的提高。联合应用 G-显带染色体核型、FISH、CNV-seq、WES 等多种遗传学方法,可发现已知致病基因和新的致病基因,为 DSD 的诊断提供支持,但当前基因检测的技术成本较高,导致患者经济负担较重,在一定程度上影响了 DSD 的诊断,下一步仍需研究更为便捷、经济性高的检测技术,提高 DSD 诊疗效率,这也是后续研究的一个方向。

综上所述,性染色体数目和结构异常是 DSD 的主要原因,联合应用 G-显带染色体核型、FISH、CNV-seq、WES 等多种遗传学方法,能满足 DSD 分子遗传学高度异质性的诊断需求,其中 CNV-seq、WES 等新技术可进行高通量的筛查和分析,有助于提高已有明确症状 DSD 患者或高度怀疑是 DSD 患者诊断率,建立基因型与表现型之间的良好关系,为 DSD 治疗、再生育等提供客观依据。

## 参考文献

- [1] 中华医学会儿科学分会内分泌遗传代谢学组. 性发育异常的儿科内分泌诊断与治疗共识[J]. 中华儿科杂志, 2019, 57(6): 410-418.
- [2] REYES A P, LEON N Y, FROST E R, et al. Genetic control of typical and atypical sex development[J]. Nat Rev Urol, 2023, 20(7): 434-451.
- [3] PRIYADARSHINI S, SHARMA R. Disorders of sex development in office practice[J]. Indian J Pediatr, 2023, 90(10): 1030-1037.
- [4] EHUA A M, MOULOT M O, AGBARA K S, et al. Disorders of sex development: challenges in a low-resource country[J]. Arch Pediatr, 2023, 30(1): 10-13.
- [5] 连晓惠, 张晓, 黄铭燕, 等. 一例 2q37 微缺失综合征患儿的遗传学分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2022, 39(1): 81-84.
- [6] 赵炜, 梁思颖, 谢宁, 等. 染色体核型分析联合染色体微阵列分析在平衡易位/倒位携带者产前诊断中的应用价值[J]. 中华围产医学杂志, 2022, 25(1): 35-41.
- [7] 沈晔, 尹婷婷, 袁文博, 等. 染色体微阵列分析和低深度高通量全基因组测序技术在流产遗传学诊断中的应用[J]. 生殖医学杂志, 2021, 30(3): 313-318.
- [8] 夏俊珂, 侯雅勤, 代鹏, 等. 低深度全基因组测序拷贝数变异分析技术在性发育异常患儿诊断中的应用价值[J]. 中华医学遗传学杂志, 2023, 40(2): 195-201.
- [9] 中华预防医学会生育力保护分会生殖内分泌生育保护学组. 性发育异常分类与诊断流程专家共识[J]. 生殖医学杂志, 2022, 31(7): 871-875.
- [10] 周静, 周冉, 王玉国, 等. 不同检测方法在羊水细胞性染色体嵌合产前诊断中的应用比较[J]. 现代妇产科进展, 2021, 30(2): 92-95.
- [11] 袁碧波, 李娜, 龙英霞, 等. 拷贝数变异测序技术在全产筛高风险且超声表现正常胎儿产前诊断中的价值研究[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2022, 38(4): 447-450.
- [12] MANTERE T, NEVELING K, PEBREL-RICHARD C, et al. Optical genome mapping enables constitutional chromosomal aberration detection[J]. Am J Hum Genet, 2021, 108(8): 1409-1422.
- [13] CROFT B, AYERS K, SINCLAIR A, et al. Corrigendum: corrigendum for: disorders of sex development: the evolving role of genomics in diagnosis and gene discovery, 108:337-350 (10. 1002/bdrc. 21148) [J]. Birth Defects Res, 2017, 109(11): 869-871.
- [14] DÉLOT E C, VILAIN E. Towards improved genetic diagnosis of human differences of sex development[J]. Nat Rev Genet, 2021, 22(9): 588-602.
- [15] 许传, 汤冬冬, 耿浩, 等. 罕见 47, XX, del(Y)(q11. 2)/46, XX 嵌合型克氏征 1 例报告并文献复习[J]. 中国男科学杂志, 2021, 35(3): 53-55.
- [16] 张欢欢, 康涵, 王凌晞, 等. 性发育异常中染色体核型和荧光原位杂交结果不一致的探讨[J]. 中国优生与遗传杂志, 2022, 30(11): 1933-1937.
- [17] 刘雪萌, 赵双霞, 朱惠, 等. 206 例 46, XY 性发育异常患者的分子诊断和临床特点分析[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2022, 38(9): 781-788.
- [18] 夏俊珂, 刘艳霞, 赵勇江, 等. 罕见特纳综合征的细胞遗传学和分子遗传学检测一例[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2021, 37(2): 162-164.
- [19] 符芳, 黎珊珊, 杜坤, 等. 对传统产前诊断阴性的先天性发育异常胎儿家系应用全外显子测序技术的分析[J]. 中华妇产科杂志, 2021, 56(7): 458-466.
- [20] FOSTER R A. Disorders of sexual development in the cat: current state of knowledge and diagnostic approach [J]. J Feline Med Surg, 2022, 24(3): 257-265.
- [21] ZITZMANN M, AKSGLAEDE L, CORONA G, et al. European academy of andrology guidelines on Klinefelter syndrome endorsing organization: european society of endocrinology[J]. Andrology, 2021, 9(1): 145-167.