

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 24520131153529

UDC\_\_\_\_\_

# 厦门大学

## 硕士学位论文

### 完全性雄激素不敏感综合征一家系基因突变分析

Complete androgen insensitivity syndrome, a pedigree gene mutation analysis

杨瑞娟

指导教师姓名: 李健教授

专业名称: 妇产科学

论文提交日期: 2016年4月

论文答辩日期: 2016年5月

学位授予日期: 2016年6月

答辩委员会主席:

评阅人:

2016年5月

# 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

## 中文摘要

### 研究背景

雄激素不敏感综合征 (Androgen Insensitivity Syndrome, AIS), 是一种常见的男性假两性畸形。是伴 X 连锁隐性遗传病。患者染色体核型为 46, XY, 但其 X 染色体上的雄激素受体 (Androgen receptor, AR) 基因存在缺陷, 可致雄激素靶器官上的 AR 出现缺陷, 体内的雄激素不能发挥相应的作用而出现相应的临床症状。此疾病可对患者的生殖能力造成不同程度的影响, 还可能引发与性发育异常相关的性心理、性行为的异常, 并可能给社会 and 患者家庭造成难以挽回的损失。目前基因诊断是 AIS 诊断的金标准, 其致病基因一直在不断的被发现, 目前有研究表明此综合征的遗传背景较为复杂多样, 故继续发掘其新的致病基因, 将有助于说明与建立疾病的表型与致病基因型之间的关联。

### 研究目的

明确 AIS 家族致病基因, 建立基因型和表型之间的关联, 为其家族成员后续的遗传咨询及产前诊断提供依据。

### 研究方法

收集 2015 年就诊于厦门市妇幼保健院妇科门诊被诊断为“雄激素不敏感综合征”的患者和其同胞姐姐(同样为 AIS)及其另一个正常同胞姐姐的临床资料和外周血液样本, 提取上述三个样本的外周血全基因组 DNA, 对此三例样本的全基因组 DNA 应用二代测序技术进行全外显子测序。进一步收集家族中其他 9 位成员的外周血液样本并进行全基因组 DNA 的提取, 应用一代测序对家族中的这 9 位成员以及上述三姐妹进行二代测序结果的验证。应用实时荧光定量 PCR 技术对上述家族中的 12 个样本进行 SRY (Y 染色体上的性别决定基因) 基因和 Y 染色体 AZF (无精子因子) a、AZFb、AZFc 缺失情况检测。通过检 III-1 的 5 $\alpha$ -脱氢酶活性浓度及其同一次采血所得的血液样本的睾酮 (T) 和二氢睾酮 (DHT) 的值来验证 III-1 的 5 $\alpha$ -脱氢酶活性是否正常。

### 研究结果

1.二代测序发现 III-1 和 III-3 存在 AR: c. 2566 C>T (R856C) 突变。2. 一代测序发现 III-1 和 III-3 存在 AR: c. 2566 C>T(R856C)突变, II-2 存在 AR: c. 2566 C>T (R856C) 杂合突变, 家族中其他成员均不存在此突变。3.SRY 基因和 Y 染色体 AZFa、AZFb、AZFc 缺失情况的检测发现两患者和其家族其他男性基因型成员均存在 SRY 基因和无 Y 染色体 AZFa、AZFb、AZFc 的缺失。4. 5 $\alpha$ -脱氢酶活性浓度检测发现 III-1 的 5 $\alpha$ -脱氢酶活性浓度正常。

## 研究结论

AR: c. 2566 C>T (R856C) 突变是造成此家系 AIS 的致病原因, 来自于患者的母亲的自发突变。5 $\alpha$ -脱氢酶活性不是造成此家系患者临床症状的原因。

**关键词:** 雄激素不敏感综合征; AR 基因; SRD5A2 基因; 二代测序技术; 5 $\alpha$ -脱氢酶。

## Abstract

### Background

Androgen insensitivity syndrome (AIS), is a common male pseudohermaphroditism. An X-linked recessive genetic disorder. The patients karyotype is 46, XY, but its androgen receptor gene on the X chromosome defects, which can cause the AR dysfunction on the androgen target organs. The androgens does not work correctly can cause relevant clinical symptoms. This disease can has different effects on the reproductive capacity in patients, but also may lead to abnormal sexual development associated with sexual psychology, abnormal behavior, and may cause irreversible damage to the patient's family and community. Currently, genetic diagnosis is the gold standard for the diagnosis of AIS, the causative genes are constantly being discovered, recently research has shown that the genetic background of this syndrome is more complex and diverse, so continue to explore its new virulence genes, Will help illustrate the association between the phenotype and pathogenic genotype of the disease.

### Objective

Clear the causative genes of the familial AIS, establish the association between genotype and phenotype, provide the basis for genetic counseling and prenatal diagnosis of subsequent family members.

### Methods

Collect the patient's clinical data and peripheral blood sample, who were diagnosed with androgen insensitivity syndrome in 2015 in xiamen city maternal and child health care department of gynaecology clinic, and the same method to her compatriot sister (same with AIS) and another normal compatriot sister. extract the above three sample whole genome DNA of the peripheral blood, application second-generation sequencing technology to fully sequenced exons of the whole genome DNA samples of the three cases. Further collect the peripheral blood samples of other nine members of the family and make the whole genome DNA

extraction, application generation sequencing technology verify the second generation sequencing results of the nine members of the family and the three sisters. Application real-time fluorescent quantitative PCR technology to detect the deletions of SRY (Sex-determining gene on the Y chromosome) gene and the Y chromosome AZFa (azoospermia factor) a, AZFb, AZFc in the 12 samples of the family. Through testing the III-1 5 $\alpha$ -dehydrogenase activity concentration and the same time blood samples of testosterone (T) and dihydrotestosterone (DHT) values to verify the 5 $\alpha$ -dehydrogenase activity of the patient is normal.

### Results

1. The second-generation sequencing found AR: c. 2566 C> T (R856C) mutation in III-1 and III-3. 2. Generation sequencing found AR: c. 2566 C> T (R856C) mutations in III-1 and III-3, AR: c. 2566 C> T (R856C) heterozygous mutations in II - 2, other members in the family are not exist the same mutation. 3. SRY gene and Y chromosome AZFa, AZFb, AZFc deletion detect found two patients and other male of their family members are present SRY gene genotype and no Y chromosome AZFa, AZFb, AZFc deletion. 4. 5 $\alpha$ -dehydrogenase activity concentration detection found 5 $\alpha$ -dehydrogenase activity concentration is normal in III - 1.

### Conclusions

The familial AIS is caused by AR: c. 2566 C> T (R856C) mutation, from the patient's mother spontaneous mutation. 5 $\alpha$ -dehydrogenase activity is not the cause of this family patients' clinical symptoms.

**Keywords:** androgen insensitivity syndrome; AR gene; SRD5A2 gene; second-generation sequencing technology; 5 $\alpha$ -dehydrogenase.

## 目 录

中文摘要 .....	I
Abstract.....	III
目 录.....	V
Contents .....	VIII
<b>第一章 前 言 .....</b>	<b>1</b>
1.1 雄激素不敏感综合征的临床表现 .....	2
1.1.1 完全型雄激素不敏感综合征 (CAIS) .....	2
1.1.2 部分型雄激素不敏感综合征 (PAIS) .....	3
1.1.3 温和型雄激素不敏感综合征 (MAIS) .....	3
1.2 雄激素不敏感综合征的病因 .....	3
1.2.1 AR 基因和 AR 蛋白结构域 .....	4
1.2.2 雄激素受体的作用机制 .....	6
1.3 雄激素不敏感综合征的诊断和治疗 .....	9
1.3.1 雄激素不敏感综合征的诊断和鉴别诊断 .....	9
1.3.2 雄激素不敏感综合征的治疗 .....	10
1.4 二代测序技术在基因病中的应用 .....	10
1.5 立题依据 .....	11
1.6 研究的目的 .....	11
<b>第二章 研究内容与方法 .....</b>	<b>12</b>
2.1 研究对象 .....	12
2.2 研究方法 .....	14
2.2.1 SRY 基因和 Y 染色体 AZFa、AZFb、AZFc 缺失情况的检测 ....	14
2.2.1.1 实验材料.....	14
2.2.1.2 仪器与实验试剂.....	14
2.2.1.3 实验方法.....	14



2.2.2 二代测序检测三病例全外显子的基因突变情况 .....	15
2.2.2.1 实验材料.....	15
2.2.2.2 实验试剂与仪器.....	15
2.2.2.3 实验方法.....	15
2.2.2.4 测序数据质量评估.....	17
2.2.2.5 测序深度、覆盖度统计.....	20
2.2.3 一代测序验证家族其他成员 AR 基因突变情况 .....	20
2.2.3.1 实验材料.....	20
2.2.3.2 实验试剂与仪器.....	21
2.2.3.3 实验方法.....	21
2.2.4 基因突变后氨基酸与蛋白质结构功能变化的预测 .....	24
2.2.5 5a-脱氢酶浓度的检测 .....	24
2.2.5.1 实验材料.....	24
2.2.5.2 实验仪器与试剂.....	24
2.2.5.3 实验方法.....	24
<b>第三章 研究结果和分析 .....</b>	<b>27</b>
3.1 SR Y 基因和 Y 染色体 AZFa、AZFb、AZFc 缺失情况的检测.....	27
3.2 二代测序检测三病例全外显子的基因突变 .....	31
3.2.1SNV 统计结果 .....	31
3.2.2SNV 注释结果 .....	36
3.2.3Indel 统计结果.....	36
3.2.4Indel 注释结果.....	43
3.2.5 测序结果分析 .....	43
3.2.5.1 测序数据质量评估.....	43
3.2.5.2 测序深度、覆盖度统计.....	49
3.3 一代测序验证家族其他成员 AR 基因突变情况 .....	52
3.4AR 基因突变后氨基酸与蛋白质结构变化的预测 .....	56
3.4.1AR 基因突变后氨基酸的改变.....	56
3.4.2 在线蛋白质结构预测软件预测氨基酸改变后蛋白质结构的改变.....	57

3.4.3 氨基酸和蛋白质改变结果分析 .....	60
3.5 5 $\alpha$ -脱氢酶浓度的检测 .....	60
第四章 讨论 .....	63
第五章 结论 .....	65
参考文献 .....	66
致 谢.....	70

## Contents

<b>Abstract in Chinese.....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract in English.....</b>	<b>IV</b>
<b>Contents in Chinese.....</b>	<b>VII</b>
<b>Contents in English.....</b>	<b>X</b>
<b>Chapter 1 Foreword.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Clinical manifestations of Androgen insensitivity syndrome.....</b>	<b>2</b>
1.1.1 Complete androgen insensitivity syndrome.....	2
1.1.2 Partial androgen insensitivity syndrome.....	3
1.1.3 Mild androgen insensitivity syndrome.....	3
<b>1.2 The pathogeny of androgen insensitivity syndrome.....</b>	<b>3</b>
1.2.1 AR gene and AR protein structure domain.....	4
1.2.2 The mechanism of androgen receptor.....	6
<b>1.3 The diagnosis and treatment of androgen insensitivity syndrome.....</b>	<b>9</b>
1.3.1 Diagnosis and differential diagnosis of androgen insensitivity syndrome.....	9
1.3.2 Treatment of androgen insensitivity syndrome.....	10
<b>1.4 The application of the second-generation sequencing technology in the genetic disease.....</b>	<b>10</b>
<b>1.5 Issue basis.....</b>	<b>11</b>
<b>1.6 The purpose of the study.....</b>	<b>11</b>
<b>Chapter 2 Research contents and methods.....</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Object of the study.....</b>	<b>12</b>
<b>2.2 Methods.....</b>	<b>14</b>
2.2.1 Detect SRY gene and Y chromosome AZFa, AZFb, AZFc deletions.....	15

<b>2.2.2 Second-generation sequencing to detect genetic mutations in all exons of the three cases.....</b>	<b>15</b>
2.2.2.1 Experimental material.....	15
2.2.2.2 The experiment reagent and instrument.....	15
2.2.2.3 Methods.....	15
2.2.2.4 Sequencing data quality evaluation.....	17
2.2.2.5 Sequencing depth, coverage statistics.....	20
<b>2.2.3 Generation sequencing verify AR gene mutation in other family members.....</b>	<b>20</b>
2.2.3.1 Experimental material.....	20
2.2.3.2 The experiment reagent and instrument.....	21
2.2.3.3 Methods.....	21
<b>2.2.4 The prediction of the changes in amino acid and protein structure after the gene mutation.....</b>	<b>24</b>
<b>2.2.5a - dehydrogenase concentration detection.....</b>	<b>24</b>
2.2.5.1 Experimental material.....	24
2.2.5.2 The experiment reagent and instrument.....	24
2.2.5.3 Methods.....	24
<b>Chapter 3 Experimental results and analysis .....</b>	<b>27</b>
<b>3.1 The results of detect SRY gene and Y chromosome AZFa, AZFb, AZFc deletions.....</b>	<b>27</b>
<b>3.2 The results of second-generation sequencing to detect genetic mutations in all exons of the three cases.....</b>	<b>31</b>
<b>3.2.1 The SNV statistics result.....</b>	<b>31</b>
<b>3.2.2 The SNV annotation result.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2.3 The Indel statistics result.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2.4 The Indel annotation result.....</b>	<b>43</b>
<b>3.2.5 Sequencing results analysis.....</b>	<b>43</b>
3.2.5.1 Sequencing data quality assessment.....	43

3.2.5.2 Sequencing depth, coverage statistics.....49

**3.3 The results of Generation sequencing verify AR gene mutation in other family members.....52**

**3.4 The results of the changes in amino acid and protein structure after the gene mutation.....56**

    3.4.1 The change of the amino acid after gene mutation.....56

    3.4.2 Online protein structure prediction software to prediction the change of protein structure.....57

    3.4.3 Results of amino acids and proteins change.....60

3.5 The results of 5 a - dehydrogenase concentration detection.....60

**Chapter 4 Discussion.....63**

**Chapter 5 Conclusion.....65**

**References.....66**

**Acknowledgement.....70**

## 第一章 前言

人类的性腺分化和发育受到多个基因和激素的共同调控,其中最重要的一个就是雄激素受体基因和雄激素,在胎儿期男性性腺的正常完整分化需要有雄激素的存在,胎儿体内的雄激素睾酮(T)是在人胎盘绒毛膜促性腺激素作用下由睾丸间质细胞分泌的,在孕7周左右开始分泌,在8到16孕周之间T的分泌达到高峰。此后,T在胎儿促黄体激素(LH)的调控之下继续分泌,但一直持续在一个较低的水平。胎儿血清中的T对Wolffian管、附睾、输精管和精囊的形成都起着重要作用。T经过 $5\alpha$ -还原酶的还原作用转变为二氢睾酮(DHT),阴茎的生长,尿道褶皱的融合,阴唇阴囊隆起以及阴茎和阴囊形成都离不开DHT的作用<sup>[1]</sup>。除了男性内部和外部生殖器结构的分化需要依赖雄激素外,睾丸下降入阴囊也部分依赖于雄激素。雄激素的正常发挥作用需要正常的雄激素受体介导。总之,男性胎儿性别分化,第二性征青春期发育,精子发生和成熟都是由AR介导的。全部或特定区域AR基因消融敲除小鼠是解开AR在雄性生殖系统所起作用的分子机制的良好动物模型。AR基因敲除的动物模型已经表明,雄激素和AR信号通路在Wolffian管、生殖结节、泌尿生殖隔形成所起的作用是胚胎性腺分化和男性内外生殖器发育的关键<sup>[2]</sup>。另外,AR在男性的生育能力、前列腺细胞的分化以及前列腺结构和功能发育方面也有着重要作用。AR的异常可导致雄激素不敏感综合征(Androgen Insensitivity Syndrome, AIS; OMIM# 300068), AIS是一种临床较为常见的男性假两性畸形。属于性发育障碍性疾病(disorder of sex development, DSD)的一种<sup>[3]</sup>。AIS被John Morris在1953年的一项临床研究中首次提出<sup>[4]</sup>。患者的染色体核型为46, XY,目前认为其是一种伴X连锁隐性遗传性疾病。占青春期女性原发性闭经的6%-10%,其发病率约为新出生婴儿的1/20000-1/64000<sup>[5]</sup>。AIS的临床表现复杂多样,其临床表现的差异主要与残存的起作用的雄激素受体的多少有关。患者可表现为一系列的雄激素抵抗的临床症状,从无生育能力外貌正常的女性到完全正常表型的有原发性不育或者无精少精症的男性不等。此病征会给患者的身心健康带来严重的影响,所以对此病征的病因进行研究,将有助于提高临床医师对本疾病的认识,并对提高对患者的诊疗水平以及更好的管理此类病人提供帮助。

## 1.1 雄激素不敏感综合征的临床表现

在临床上根据患者对雄激素敏感程度的不同而致的不同临床表现，将雄激素不敏感综合征分为完全型雄激素不敏感综合征（Complete Androgen Insensitivity Syndrome ,CAIS）、部分型雄激素不敏感综合征（Partial Androgen Insensitivity Syndrome ,PAIS）以及温和型雄激素不敏感综合征（Mild androgen insensitivity syndrome, MAIS）三种类型<sup>[6]</sup>。

### 1.1.1 完全型雄激素不敏感综合征（CAIS）

CAIS 典型的临床表现是青春期的原发性闭经或者婴幼儿期的腹股沟肿块。患有此疾病的青春期女性有正常的乳房发育但乳头、乳晕则发育差，并无月经来潮<sup>[7]</sup>。腋毛稀少或者缺如，阴毛呈女性型分布但较稀少<sup>[8]</sup>。患者的性腺通常是隐睾，位于腹股沟管、骨盆或阴唇。因患者无生精功能的睾丸组织能正常分泌 AMH 激素，此激素可使苗勒氏管退化，所以女性内生殖系统如子宫、宫颈、卵巢一般是缺如的，一般有一个盲端阴道，长短不一，从只有一小隙到正常不等<sup>[9]</sup>。

CAIS 患者有着身高的正常快速增长，其平均身高常高于同龄女性身高的平均值，但低于同龄男性身高的平均值<sup>[10]</sup>。有研究表明在做去势手术前相对缺乏雌激素的体内条件下，推迟做去势手术的患者身高会更高<sup>[11]</sup>。但是，目前并没有研究证据表明，具有 AIS 女孩的青春启动迟于无此征的女孩<sup>[12]</sup>。AIS 患者的身高相对较高主要是因为位于 Y 染色体长臂上的生长调节区域起作用的结果，经全基因组关联分析（GWAS）已经确定了几个可以影响 AIS 患者身高的几个基因位点<sup>[13]</sup>。还有研究表明，有 AIS 的婴儿出生时平均身长与正常男婴相同，并再次说明了影响患者身高是由于 Y 染色体上基因的因素而不是产前暴露于高雄激素所致<sup>[14]</sup>。

CAIS 的女性具有激素抵抗状态的内分泌特征。血清睾酮浓度位于或高于正常男性的正常值范围，黄体生成素（LH）常有不同程度的异常升高<sup>[15]</sup>。卵泡刺激和抑制素常在正常范围内。体内过量的雄激素在外周芳香化酶的作用下转变为雌激素以及由 LH 直接刺激睾丸组分泌的雌激素，而导致血清中的雌激素水平高于正常男性，但低于无此征的正常女性<sup>[16]</sup>。在 AIS 患者体内对下丘脑-垂体进行负反馈调节的不是体内的雄激素而是靠体内雌激素的局部负反馈作用来维持此

负反馈效应。人体内雄激素的运输和发挥作用离不开性激素结合球蛋白，而体内性激素结合球蛋白是由肝脏合成的，此蛋白的合成受到体内性激素和雌激素的双重调控，体内的雄激素减少和雌激素升高的时候都会刺激肝脏合成性激素结合球蛋白。而有 CAIS 的女性该蛋白质的浓度和正常的没有此综合征的女性类似，并且在增加体内的雄激素后无降低<sup>[17]</sup>，说明雄激素结合蛋白不会对患者的临床症状产生影响。

### 1.1.2 部分型雄激素不敏感综合征 (PAIS)

PAIS 的临床表现具有多样性，其表现主要取决于外生殖器对雄激素反应的敏感程度。此类患者外生殖器多表现为男性或者呈男性倾向的假两性畸形<sup>[18]</sup>。典型的临床表现包括：小阴茎、严重尿道下裂（会阴阴囊型）以及可能含有性腺的双歧阴囊。患者常有隐睾，少数患者睾丸下降，此睾丸无生精功能，但睾丸支持细胞是正常的。与 CAIS 一样无苗勒氏管结构，可有中肾管衍生器官存在，但常发育不良。至青春期男性第二性征发育不良，如：阴毛稀少、睾丸较小、生殖细胞停止发育等。有部分有男性乳房女性化。除了阴蒂增大的程度不同，外生殖器的外观与 CAIS 较为一致的临床表现也偶有报道。这是一种严重类型的 PAIS，在性别归类时一般归为女性<sup>[7]</sup>。同 CAIS，患者血清中的睾酮和 LH 也有不同程度升高，并且增加血液睾酮水平同样不能抑制 LH 的升高。

### 1.1.3 温和型雄激素不敏感综合征 (MAIS)

MAIS 近几年来被频繁报道，此类患者并无外生殖器的异常<sup>[18]</sup>。常因不育而来院就诊<sup>[19, 20]</sup>。患者有雄激素缺陷的证据，如：伴有精子减少的正常水平的睾酮和不适当的 LH 升高<sup>[21]</sup>。在经过高剂量的雄激素治疗后如果精子数量有所恢复，患者的生育是有可能的<sup>[22]</sup>。在小鼠雄激素受体敲除实验条件下的研究结果表明，正常功能的受体表达是支持和间质细胞正常产生精子所必不可少<sup>[23]</sup>。所以 MAIS 的患者一般是无精子或者精子数量较少。

## 1.2 雄激素不敏感综合征的病因

目前，认为与 AIS 有关的基因是位于 Xq11-12 上的长 90Kb 的雄激素受体



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.