

200 例原发性闭经患者细胞遗传学分析

李显箏 许玲 黎凤珍 蔡婵慧

(广东省妇幼保健院 医学遗传中心, 广东 广州 511400)

【摘要】 目的 探讨女性原发性闭经与性染色体异常的关系。**方法** 对广东省妇幼保健院 2013 年 1 月至 2017 年 12 月就诊的 200 例原发性闭经患者进行外周血染色体核型分析。**结果** 200 例原发性闭经患者中共检出 50 例性染色异常, 异常比例 25%。其中 X 染色体数目异常 16 例(8%); X 染色体结构异常 8 例(4%); X 染色体数目伴结构异常 15 例(7.5%), 含 Y 染色体 11 例(5.5%)。**结论** 性染色体异常是女性原发性闭经的重要原因, 对患者行外周血染色体核型分析, 必要时行比较基因组杂交检测, 对明确其病因以及选择治疗方法具有非常重要的意义。

【关键词】 原发性闭经; 染色体核型分析; 性染色体

【中图分类号】 R711.51 **【文献标识码】** A

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between primary amenorrhea and abnormal sex chromosome karyotype abnormality in female. **Method** A total of 200 patients with primary amenorrhea were enrolled in our hospital from January 2013 to December 2017 for peripheral blood chromosome karyotype analysis. **Results** Of the 200 patients with primary amenorrhea, 50 cases were abnormal in chromosome karyotype, the abnormal rate was 25%. X chromosome number abnormality in 16 cases, accounting for 8%; X chromosome structure abnormalities in 8 cases, accounting for 4%; X chromosome number with structural abnormalities in 15 cases, accounting for 7.5%, with Y chromosome in 11 case, accounting for 5.5%. **Conclusions** Sex chromosome abnormality is an important cause of primary amenorrhea in female. It is of great significance to analyze the karyotype of peripheral blood chromosomes and to detect comparative genomic hybridization if necessary for the determination of the etiology and the choice of treatment methods.

【Key words】 primary amenorrhea; karyotype analysis; sex chromosome

目前, 不孕不育症对生育的影响越来越大, 而闭经则是引起女性不孕的第 6 大因素。原发性闭经是指女性年龄超过 14 岁、第二性征未发育、从未有过月经, 或年龄超过 16 岁、第二性征已发育, 月经仍未来潮, 其发病率约 0.1%^[1]。大部分原发性闭经患者在未进行正规的遗传学评估的情况下就盲目采取了激素补充治疗, 而不必要且过量的激素则带来了一系列的临床问题^[2]。本文将通过对 2013 年 1 月至 2017 年 12 月本院就诊的 200 例原发性闭经患者行外周血染色体核型分析, 进一步了解原发性闭经

患者的性染色体异常率及异常核型的种类。

1 对象与方法

1.1 对象 广东省妇幼保健院 2013 年 1 月至 2017 年 12 月因无月经初潮来本院就诊的 200 例原发性闭经女性患者, 临床表现及社会性别均为女性表型, 且尚未用药治疗。

1.2 方法 签署知情同意后, 无菌注射器抽取肝素抗凝外周血 3 ml, 取 0.5 ml 接种于淋巴细胞培养基内, 37℃ 恒温箱培养 72 h, 培养完成前 2 h 加浓度为 100 μg/ml 的秋水仙素 25 μl 后, 继续培养 12 min, 取培养液以 1 500 rmp 离心 6min, 弃上清,

加入预温至 37 ℃ 的低渗液(0.075 mol/L KCl 溶液)6 ml,于 37 ℃ 水浴 30 min,加 2 ml 新鲜配制的甲醇、冰醋酸固定液(3:1),轻轻混匀,以 1 500 rpm 离心 6 min,弃上清,加入新配固定液约 5 ml,离心,按以上方法再固定一次,弃上清,将沉淀调成细胞悬液进行滴片。60 ℃ 烤箱烤 16h。自然冷却后,常规 G 显带,Zeiss 染色体核型扫描分析系统扫描,计数 20 个中期分裂相,分析至少 5 个核型;嵌合体病例计数至少 100 个中期分裂相。染色体多态性如 9 号染色体臂间倒位、着丝粒异染色质区变异、随体变异

等均详细描述,并归入正常染色体核型。按照人类细胞遗传学国际命名体制(ISCN2013)的标准命名核型。

2 结果

200 例原发性闭经患者,平均年龄约为 20 岁,其中检出 50 例性染色体异常,异常核型比例 25%。其中 X 染色体数目异常 16 例、占 8%;X 染色体结构异常 8 例,占 4%;X 染色体数目伴结构异常 15 例,占 7.5%,含 Y 染色体 11 例,占 5.5%。(见表 1)

表 1 200 例原发性闭经患者外周血染色体核型分析结果及临床表现

核型	例数 [例(%)]	临床表现	
正常核型	46,XX	150(75)	第二性征不明显,身材矮小,先天性阴道闭锁,无阴道;子宫发育不全,幼稚子宫,子宫缺失;生殖器畸形;胰岛素抵抗,甲状腺功能亢进,多囊卵巢综合征;卵巢功能障碍
X 染色体数目异常	45,X	12(6)	第二性征不明显,无阴毛,胸部未发育,Turner 体征明显,身材矮小,子宫发育不全,青春期延迟,子宫缺如或幼稚子宫,卵巢未发育
	45,X/47,XXX	3(1.5)	子宫发育不良,性腺条索状
	45,X/46,XX	1(0.5)	第二性征不明显,子宫发育不全
X 染色体结构异常	46,X,i(X)(q10)	4(2)	Turner 体征明显,幼稚子宫,卵巢未发育,外阴幼稚
	46,X,idic(X)(p22.3)	1(0.5)	卵巢功能障碍,子宫发育不全
	46,X,? t(X;4)(q22;p16)	2(1)	子宫偏小,甲状腺功能减退
	46,X,t(X;16)(q21.2;q13.1)	1(0.5)	卵巢早衰
性反转	46,XY	11(5.5)	子宫发育不全;先天性子宫缺失;两性畸形
X 染色体数目异常伴结构异常	mos 45,X/46,X,i(X)(q10)	6(3)	先天性无卵巢;生殖道畸形
	mos 45,X/46,X,psu idic(X)(p11.2)	2(1)	卵巢发育不全,生长发育迟缓,子宫缺失,高胰岛素血症(功能性);高尿酸血症
	mos 46,X,del(X)(q21)/45,X	2(1)	幼稚子宫,卵巢未发育,第二性征发育欠佳
	mos 45,X/46,X,der(X)? r(X)(?;?)	3(1.5)	女性原发性不育;子宫发育不全;
	mos 45,X/46,X,+mar	1(0.5)	子宫发育不全,身材矮小
	mos 45,X/46,X,add(X)(q? 27)	1(0.5)	卵巢功能障碍,幼稚子宫

3 讨论

原发性闭经发病原因复杂多样,约 20%~40% 的原发性闭经患者存在性染色体异常。本研究发现原发性闭经患者性染色体的异常率为 25%,进一步证实性染色体异常是原发性闭经的重要原因之一。

3.1 X 染色体数目异常与原发性闭经 本研究共检出核型为 45,X 12 例,及 45,X 嵌合型 1 例。45,X(Turner 综合征)的产生原因主要是在生殖细胞减

数分裂过程中 X 染色体的不分离。Lyon 假说认为:①哺乳动物的正常雌性细胞中,有一条 X 染色体是处于失活状态的;②失活是随机的,可能来自父母任意一方;③失活发生在胚胎发育早期,一旦发生,其子细胞中将保持恒定失活。X 染色体失活可能是 45,X 能够存活的一个重要原因。但是,失活的 X 染色体上有部分基因是逃逸基因,这些逃逸基因在生长发育的调控中发挥重要作用,如位于 X 染色体的短臂末端区域的 *SHOX*^[3] 基因,其剂量上的

减少是导致 45,X 患者身材矮小的主要原因。典型的 45,X 表现为 Turner 综合征,其特点为出生时低体重,身材矮小,性腺发育不全,闭经,蹼颈,后发际低,肘外翻等。同单纯的 45,X 相比,45,X 嵌合型的患者临床表现会有不同程度的减轻,其表型和性腺分化程度取决于分化过程中体细胞和生殖细胞中 45,X 与正常细胞的比例,正常细胞的比例越高越接近正常人的表型。

3.2 X 染色体结构异常与原发性闭经 本研究共检出 X 染色体结构异常 8 例,其中 4 例为 X 长臂等臂染色体,1 例 X 双着丝粒染色体,3 例 X 染色体与常染色体易位。X 染色体失活及逃逸现象,是我们认识涉及 X 染色体的性发育异常患者不同临床表现的遗传理论基础。根据 Lyon 假说,当 X 染色体与常染色体发生易位时,大多数情况下是正常的 X 染色体优先失活,从而患者为平衡易位携带者,表型上无异常。而实际上,本文中的 3 例 X 染色体与常染色体易位患者虽然表型上无明显异常,但也出现了不同程度的发育问题。究其原因,可能是正常的 X 染色体失活的位置效应,也可能是 X 染色体断裂重接处发生了部分基因的缺失。

3.3 X 染色体数目伴结构异常与原发性闭经 本研究检出的 X 染色体数目伴结构异常病例中,均为异常 X 染色体与 45,X 的嵌合体,各自嵌合比例不同导致其表型不同。若 45,X 核型在体细胞和生殖细胞中所占比例较高,则表型更倾向于 Turner 综合征的表型。若异常 X 核型在体细胞和生殖细胞中所占比例较高,则因不同区段承载的基因不同,缺失、易位导致的症状也不同。

Wyss 等^[4]曾绘制了 X 染色体假定基因位置的模式图,提示决定性腺发育的基因位于 X 染色体的短臂 Xp11-Xpter 区域以及长臂 Xq27-q28 区域,而决定躯体正常发育的基因位于 Xp11-Xp12 和 Xq21-Xq26 区域。而 Xq13-Xq27 则是卵巢发育和功能维持的关键区域^[5],卵巢早衰的相关致病基因如 *FMR1*、*DIAPH*、*POF1B* 等均位于该区域内^[6],当 X 染色体与常染色体发生易位,断裂点在这两个功能区中时,可导致卵巢早衰,卵巢体积小或成条索状。本文中有一例 X 与 16 号染色体易位,其 X 断

裂点位于 Xq13.1,患者出现了卵巢早衰的症状。当 X 染色体长臂缺失,由于断裂点正好在卵巢关键区域内,因此患者会出现原发闭经,卵巢发育不良,激素水平异常等症状,而这些患者由于 X 短臂未缺失,身高多表现正常^[7]。

3.4 46,XY 性反转综合征与原发性闭经 本研究共检出 11 例核型为 46,XY 的女性原发性闭经患者,此类患者属于性反转综合征。性反转综合征主要涉及生殖发育异常,主要表现为性腺、性别与染色体核型不相符,临床表现为女性外观、性腺条索状、女性幼稚型外阴、阴蒂肥大、阴道短浅且为盲端、第二性征发育差、出现喉结等男性体征、睾丸不发育、两性畸形等。目前导致该病的原因主要有以下几种假说:① Y 染色体上的 *SRY* 基因突变或缺失^[8],*SRY* 是男性性别决定基因,位于 Y 染色体短臂区域,对睾丸的形成具有关键作用,因此,*SRY* 基因的突变可导致 46,XY 女性的形成;② *SOX9* 基因突变^[9]:*SOX9* 基因被称为躯干发育异常基因,*SOX9* 突变可破坏蛋白质结构和功能,导致 46,XY 个体的性反转和躯干发育异常;③ 其他性别决定相关基因突变:性别决定和分化是一个以 *SRY* 基因为主导的、多基因参与的有序协调表达过程,其中某一基因的突变就可能导 致性反转的发生;④ 患者存在未检出的 46,XX/46,XY 嵌合体:因目前染色体核型分析多采用静脉血,难以发现内、外、中胚层间的嵌合体,若性腺组织中存在 46,XX/46,XY 真性嵌合体,其生殖腺发育则会出现两性畸形。目前认为 *SRY* 基因的突变和缺失是导致 46,XY 女性性反转的主要原因。

同时,有学者认为携带 Y 染色体或其来源序列的女性患者,其发生性腺母细胞瘤和无性细胞瘤的风险约为 30%~75%,因此该类患者需定期检查,一旦发现患病应及时手术治疗^[10]。

3.5 染色体微小缺失、重复与原发性闭经 本研究中的 200 例原发性闭经患者,核型为 46,XX 的患者有 150 例,占受检总数的 75%。染色体核型虽然正常,但染色体上可能存在某种微小的缺失、重复或易位,或者某个基因的缺陷,有待在分子水平上进一步研究。国外有学者用比较基因组杂交技术对染色体

核型正常的卵巢早衰患者进行检测,发现有部分患者存在性染色体微缺失^[11]。因此,对于染色体核型正常的原发性闭经患者,有必要进一步行比较基因组杂交检测,以排除染色体微缺失、微重复的可能性。

综上所述,性染色体异常是导致原发性闭经的主要原因之一。对于该类患者应及时行细胞遗传学检测,通过染色体核型分析鉴定,对核型正常但表型异常的患者需进一步采用比较基因组杂交等分子水平检测,以排除微小缺失、重复等。尽量做到早发现早治疗,从而降低生殖腺恶变,减少患者的心理负担,提高患者的生活质量。

参 考 文 献

[1] 汪晶冰,马洪星,王亚婷,等. 93 例原发闭经患者的染色体核型及临床分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2015(11):57-116.

[2] 邵文嘉,王武亮,邓克红,等. X 染色体结构异常与闭经及身材矮小的临床相关性分析[J]. 中国妇幼保健, 2015(06):926-929.

[3] Seo G H, Kang E, Cho J H, et al. Turner syndrome presented with tall stature due to overdosage of the SHOX gene[J]. *Ann Pediatr Endocrinol Metab*, 2015,20(2):110-113.

[4] 孙迎春,徐亚茹,王晓燕,等. 女性性腺发育不良 30 例遗传学与临床分析[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2002(07):49-50.

[5] Toniolo D. X-linked premature ovarian failure: a complex disease[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2006,16(3):293-300.

[6] Jiao X, Qin C, Li J, et al. Cytogenetic analysis of 531 Chinese women with premature ovarian failure[J]. *Hum Reprod*, 2012,27(7):2201-2207.

[7] 唐桂芝,龙志高,李娟,等. 36 例 X 染色体异常的遗传学分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2014(08):55-56.

[8] 叶长烂,万淑梅,江悦华,等. 46,XY 女性性反转患者细胞遗传学检测[J]. 中国优生与遗传杂志, 2013(05):69-70.

[9] 侯林,崔英霞,姚兵. 性别决定相关基因 SOX9 研究进展[J]. 中国优生与遗传杂志, 2007(08):1-2.

[10] Jorgensen PB, Kjartansdottir KR, Fedder J. Care of women with XY karyotype: a clinical practice guideline[J]. *Fertil Steril*, 2010,94(1):105-113.

[11] Liao C, Fu F, Yang X, et al. Analysis of Chinese women with primary ovarian insufficiency by high resolution array-comparative genomic hybridization[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2011,124(11):1739-1742.

(收稿日期:2018-12-01)

编辑:宋文颖