

# 哺乳动物性别决定的分子要素\*

邓 恽 王金星

(山东大学生命科学学院 济南 250001)

**关键词** 性别决定 wt1 SOX9 SRY mis SF-1

哺乳动物性别分化是由胚胎时期性腺分泌的激素控制,而在激素分泌前,XX和XY胎儿都具有牟勒氏管(Müllerian duct),吴夫氏管(Wolffian duct)两套生殖导管和未分化的性腺。牟勒氏管将来分化为输卵管,子宫等雌性生殖道,吴夫氏管则分化为输精管,副睾等雄性生殖道。所以,正常雄性或雌性只应含有一套生殖导管,另一套退化。牟勒氏管的退化是由胚胎时期精巢足细胞分泌的牟勒氏管抑制因子(Müllerian Inhibitory Substance, MIS)引起,随后精巢间质细胞(Leydig 细胞)分泌睾酮诱导吴夫氏管发育为雄性生殖器官;若没有精巢,也就没有 MIS 和睾酮,则吴夫氏管退化,同时形

成了适宜牟勒氏管发育的环境,牟勒氏管发育为雌性生殖器官。

由此可见,MIS 和睾酮使雄性性别分化先于雌性性别分化,雄性表型的出现得助于睾酮,睾酮由精巢分泌。那么又是什么决定了精巢的发育呢?研究表明,Y 染色体性别决定区(Sex-determination Region Y, SRY)是核心,SRY 直接诱导精巢发育。

目前发现,性别决定过程中有三种基因调

---

\* 本文由山东大学跨世纪人才基金资助;

第一作者介绍:邓 恽,女,24 岁,硕士;

收稿日期:1997-03-24,修回日期:1997-06-20

控未分化性腺的发育及雄性性别决定,分别是威尔氏(Wilms)瘤的抑制基因 *wt1*,类固醇生成因子(Steroidogenic Factor1, SF-1)基因<sup>[1]</sup>, SRY 及 SRY 同源基因即 SRY-盒基因(SRY-related HMG-box genes, SOX)<sup>[2]</sup>。这三种基因的产物都有 DNA 结合结构域和转录激活/抑制结构域,与 DNA 结合从而调控转录,并都在性腺表型变化前表达,*wt1* 和 SOX 突变除了影响性腺发育外,还影响其它多个器官系统的发育,故说明它们在早期胚胎发育过程中有作用。现将三种基因的性质和作用简述如下:

## 1 威尔氏瘤的抑制基因 *wt1*

*wt1* 基因位于第 17 号染色体,突变将导致 Denys-Drash 综合症,其特征是患 Wilms 瘤,肾和性腺发育异常。WT1 蛋白的 DNA 结合结构域为 4 个 Cys-Cys 锌指。对 Denys-Drash 患者的研究发现 WT1 变化多发生在 DNA 结合结构域表面和与  $An^{2+}$  配位的区域,推测由于基因突变影响了 WT1 的 DNA 结合结构域的完整性,从而影响了 WT1 的转录调控作用。

*wt1* 基因突变导致多种表型效应是由于其产物有四种蛋白异型体。产生蛋白异型体的原因可能是由于 mRNA 转录后不同的拼接方式使同一种基因产生具有部分相同结构的蛋白质。不同蛋白质结合不同 DNA,可能识别不同启动子,从而调控不同基因表达。*wt1* 基因突变打破蛋白异型体的比例,无法调节某些基因的转录,导致多种表型效应如 Wilms 瘤,性别逆转等。

*wt1* 基因的表达在胚胎发育中 Leydig 细胞从中肾管移出形成精巢的时期,研究发现表现性腺畸形(或其它缺陷)的 Denys-Drash 患者的锌指 3 第 394 位氨基酸由精氨酸(Arg)变为酪氨酸(Try),有的患者有牟勒氏管和吴夫氏管两套结构,有的二者都没有。*wt1/wt1* 小鼠因为没有肾和性腺,在妊娠过程中即死亡,组织学分析发现这类小鼠的肾干细胞仍处于“幼态”,即没有分化,推测这是由于缺少 *wt1* 基因所致。*wt1* 基因有抑制细胞分裂和诱导细胞分

化的功能,并与间质细胞分化形成精巢有关。体外共转染实验证明 WT1 蛋白质的 DNA 结合结构域外的区域有较强的转录抑制作用,这部分富含谷氨酸(Glu)和脯氨酸(Pro)。WT1 是转录抑制因子,抑制 Wilms 瘤的发生,目前尚未发现性腺发育过程中直接受其调控基因。

## 2 高度可动性蛋白质 HMG

HMG(High Mobility Group)蛋白是指有高迁移率,能与 DNA 结合的非组蛋白,SOX 的编码区有 60% 以上与 HMG 的 HMG-box 同源,这类基因有几种在胚胎发育时期表达,其中 SOX9 是性腺发育早期一个重要的基因。它位于人的第 17 号染色体(小鼠的第 11 号染色体),发生突变将导致 Campomelic dyspsia 症,其特征是骨骼发育缺损,大约有 30% 的患者还同时是 46,XY 雌性,他们的 SOX9 或是发生了突变或是其上游基因易位  $t(7:17)$ ,  $t(13:17)$ 。突变是单基因突变<sup>[3]</sup>,为什么单基因突变会导致骨骼发育不良与精巢发育不全呢? SOX9 在早期胚胎发育时表达,它的表达与间质细胞从中肾管移出形成精巢有关,间质细胞从中肾管移出对精巢的形成十分必要,间质细胞也分化形成骨和软骨。

从 3 个 46,XX 雄性和 1 个 46,XX 两性患者中发现其基因组中携带着一段 3.5kb(千碱基对)的 Y 染色体特有的 DNA 序列<sup>[4]</sup>,分析这段序列后,将它的编码区命名为 SRY<sup>[5]</sup>,同时也从小鼠中克隆到相应的基因,称 Sry<sup>[6]</sup>。人 SRY 为单一的外显子,无内含子,含有一个与编码 HMG1、HMG2 蛋白 A、B 结构域高度同源的序列,即 HMG 盒(HMG-box),SRY 在进化上具有的高度保守性也仅见于这一区域,对多数物种的这段区域分析表明 HMG-box 是 SRY 中唯一有功能的,小鼠 Sry 结构上也具有保守的 HMG-box,但还含有一段谷氨酸(Glu)富含区以及拼接供体和受体位点,小鼠 Sry 在 10.5d.p.c<sup>1)</sup>~12.5d.p.c 生殖腺嵴中表达,这

1)d.p.c. 全称为 Days Post Coitus(交配后……天)

正是性腺开始分化之前的时期。成年人,小鼠精巢中 SRY, Sry 表达: SRY 转录区为 850bp, 翻译区为 612bp; 小鼠 Sry 由于含有拼接供体和受体位点成年鼠精巢转录物拼接成一环状分子, 还没有实验证明该环状转录物能够翻译, 也没有发现成年人精巢中 SRY 具有其在生殖嵴类似的生物活性, 这说明 SRY/Sry 具有表达时间特异性, SRY/Sry 只在精巢组织中表达即具有表达组织特异性。一般认为 SRY/Sry 通过调控其它基因的表达调控精巢的发育。

前面已述 SRY/Sry 编码 HMG 蛋白, HMG 蛋白结构呈 L-型<sup>[7]</sup>, 主要是保守的芳香族氨基酸。两臂夹角约为 80 度。HMG 蛋白特异地与 DNA 双螺旋一侧作用<sup>[8]</sup>, 其 DNA 结合域中任何一个氨基酸的突变都会减弱与 DNA 的亲和力 1~3 个数量级。HMG 蛋白识别靶序列是 5'-CCAATTTC-3'<sup>[9]</sup>, 在许多基因上游都发现了这一序列。甲基化干扰实验显示 SRY 蛋白通过与 DNA 双螺旋小沟内核苷酸相互作用识别上述核心序列; 有人认为 SRY 蛋白部分嵌入一个尖锐的 DNA 弯曲中心小沟内  $\alpha$ -螺旋, 破坏其碱基堆积力, SRY 蛋白特异的识别序列只是提供其插入所需的高级结构<sup>[10]</sup>, 而非直接阅读碱基序列。关于 SRY 蛋白调控机理, 一种新解释认为 SRY 蛋白与受其调控基因的启动子序列相互结合, 使其弯曲而影响活性<sup>[11]</sup>。

现已发现一些基因的特定序列能与 SRY 蛋白结合, 推测它们可能就是受其调控的候选基因, 其中 p450 芳香酶基因和牟勒氏管抑制因子的启动子与 SRY 蛋白有较强的亲和性。

### 3 类固醇生成因子 SF-1

MIS 是胚胎足细胞分泌的第一物质, 它在 SRY 表达后 20 小时内表达, 是类似反式生长因子  $\beta$  (Transforming Growing Factor  $\beta$ , TGF $\beta$ ) 的激素, 雄性胚胎中 MIS 诱导牟勒氏管退化<sup>[12]</sup>。体外实验提纯的 MIS 在小鼠胚胎卵巢中诱导出一个似精巢的带索状结构, 这表明 MIS 有多效性, 即抑制雌性生殖道的发育和诱

导精巢发育。

小鼠 mis 基因位于第 10 号染色体, 作为 SRY 蛋白的靶基因, SRY 蛋白如何与 mis 相互作用呢? 将 SRY 的表达载体与一个报道基因共转染含 mis 的细胞, 发现 SRY 蛋白能激活其启动子。此外, DNA 酶 1 脚印法实验也发现 SRY 蛋白结合该启动子的 24bp, 但凝胶电泳表明 SRY 蛋白与 mis 间无直接作用, 需要另一个中介因子 SF-1 (Steroidogenic factor)。SF-1 是一种孤核受体蛋白<sup>[1]</sup>, 它的 cDNA 与小鼠中来源于癌细胞 cDNA 文库的 cDNA 极为相似, 后者称为胚胎长末端重复序列结合蛋白 (embryonal long terminal repeat-binding protein, ELP)。分离鉴定二者的基因克隆发现 SF-1 和 ELP 的结构与从果蝇中分离的另一种孤核受体蛋白 FTZ-F1 十分相似, 因而将小鼠中编码的基因称为 Ftz-F1。Ftz-F1 在 9~9.5d.p.c 生殖嵴中表达, 这正是性腺开始发育的时期, 实验已确定 Ftz-F1 对肾上腺与性腺的发育都是必须的; SF-1 是肾上腺皮质细胞中调节肾上腺皮质激素表达的关键; 成年小鼠中 SF-1 在几乎所有产生甾族化合物的组织中表达, 如肾上腺皮质, 精巢 Leydig 细胞等; SF-1 也在足细胞中表达。可见, SF-1 不仅对甾族化合物的产生是必须的, 而且也是早期胚胎发育的关键物质, 与 WT1 蛋白质一样调节胚胎早期细胞分化。

此外, SF-1 还直接调节 MIS 基因的表达。胚胎早期足细胞转染发现 SF-1 与 mis 的调控区 mis-RE-1 相互作用激活 mis, 同时发现对其它细胞系 SF-1 则不表现活性, 早期足细胞可能含 mis 转录依赖的其它因子。后来发现 SF-1 除了有明显的 DNA 结合结构域外还有配体结合区, 早期足细胞中含有 SF-1 配体, 配体与配体结合区结合使后者脱离 SF-1。SF-1 转变为活性形式而促进 mis 转录。近来发现 SF-1 也结合 dax-1 基因的启动子, 诱导其转录。dax-1 无义突变将导致 X-连锁的先天性肾上腺上发育不全。dax-1 位于 Xp21~22.3, 包括一个 160kb 的 DSS 区, DSS 区是导致性别逆转的 X 染色体上的敏感剂量区, 正常情况 DSS 区无活

性, DAX-1 是使 DSS 区失活的因子, 但具体使其失活的位点尚不知, 用 XY 雌性小鼠的 DSS 区和多拷贝的 *dax-1* 构建的转基因小鼠能回答这一问题。

SF-1 和 WT1 都是胚胎发育早期细胞分化的关键, 早期胚胎性腺退化与 SF-1 和 WT1 基因的表达混乱有关, 所以对  $FtZ^{-}/FtZ-F1^{-}$  动物 *wt1* 表达的研究以及  $wt1^{-}/wt1^{-}$  动物 *FtZ-F1* 表达的研究可以揭示它们在性腺发育过程中是相互独立作用还是互相合作, 基因间是如何通过相互作用指导细胞分化的。

总之, 胚胎发育受一系列基因的调控。在胚胎发育早期, 多种孤核受体蛋白如 WT1, SOX 蛋白(包括 SRY 蛋白)诱导细胞分化为肾、性腺、肾上腺、骨骼等。雄性动物的继续发

育以 SRY 为核心, 连瀑式调控基因表达。SRY 为雄性动物 Y 染色体特有区的基因, 诱导精巢发生, SRY 启动 SF-1 基因转录, SF-1 激活 *mis*, *mis* 表达, 牟勒氏管退化, 吴夫氏管在精巢分泌的睾酮作用下分化出雄性生殖器官, 雌性动物无 SRY, 性腺发育为卵巢, 同时 SF-1 含量下降, *mis* 不表达, 牟勒氏管不退化, 吴夫氏管则因无睾酮而退化, 牟勒氏管分化出雌性生殖器官。SRY 作为精巢决定因子, 又是如何调控精巢的发生呢? 根据 SRY 阴性的个体发生性别逆转提出哺乳动物细胞决定的遗传模型(见图 1)<sup>[13]</sup>。

图 1 表明: 两性动物中均存在表现为雄性的基因, 但通常情况这些基因的活性被抑制因子(Z)抑制。

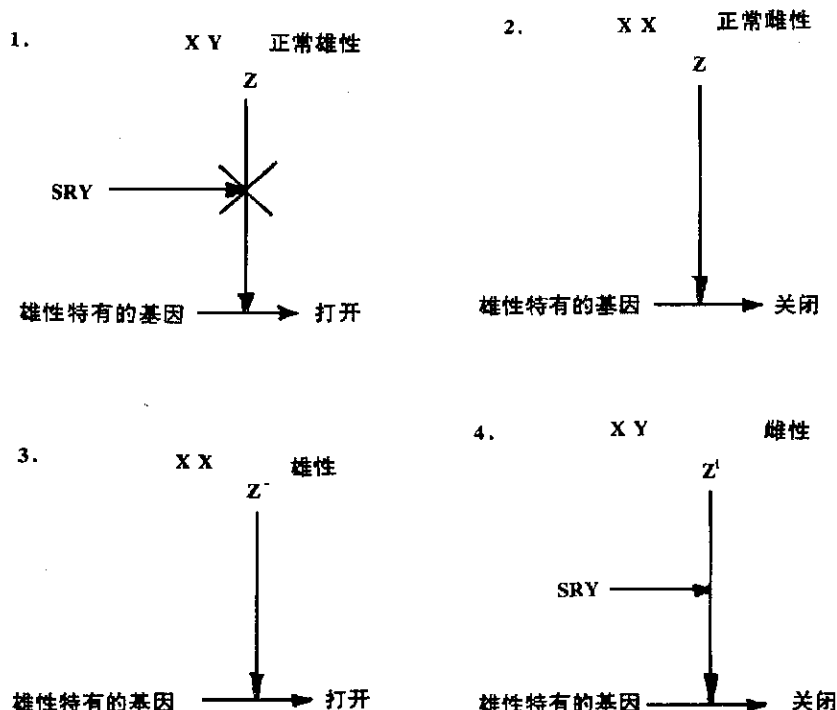


图 1 哺乳动物性别决定的遗传模型

1. 表示正常的雄性动物含有 SRY, SRY 蛋白抑制 Z 的作用而使动物表现雄性; 2. 表示正常雌性动物无 SRY, 无法解除抑制, 不表现雄性; 3. 表示 XX 个体缺乏抑制因子 Z, 失去抑制作用, 表现性别逆转; 4. 表示抑制因子突变后对 SRY 不敏感, 无法解除抑制, XY 个体发生性别逆转。

## 参考文献

- 1 Ikeda, Y., W-H. Shen, H. A. Ingraham, K. L. Pankert. Developmental expression of mouse steroidogenic factor 1, an essential regulator of the steroid hydroxylase. *Mol. endocrinol* (in press), 1995.
- 2 Foster, J. W., M. A. Dominguez-steglich, M. A. S. Gullotti, C. Kwok, P. A. Weller, M. Stevanovic, J. Weisenbach, S. Mansour, I. D. Young, P. N. Goodfellow, J. D. Brook, A. J. Schafer. Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutation in an SRY-related gene. *Nature*, 1994, **372**:525~530.
- 3 Wagner, T., J. Wirth, J. Meyer, B. Zabel, M. Held, J. Zimmer, J. Pasantes, F. D. Bricarelli, J. Keutel, E. Huser, U. Wolf, N. Fommerup, W. Schempp, G. Schrör. Autosomal Sex Reversal and Campomelic Dysplasia Are Caused by Mutations in and Around the SRY-related Gene SOX9. *Cell*, 1994, **79**:1111~1120.
- 4 Goodfellow, N., N. E. Abbas, M. Fellous. Genetic evidence that ZFY is not the testis-determination factor. *Nature*, 1989, **342**:937~939.
- 5 Sinclair, A. H., P. Berta, M. S. Palmer, J. R. Hawkins, B. L. Griffiths, M. J. Smith, J. W. Foster, A. M. Fvischauf, R. Louell-Badge, P. H. Goodfellow. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*, 1990, **346**:240~245.
- 6 Koopman, P., J. Gubbay, N. Vivian, P. H. Goodfellow, L. B. Robin. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature*, 1991, **351**:117~121.
- 7 Wei, H. M., C. S. Hill, P. J. Kraulis. Structure of the B-domain of the HMG1. *EMBO J.*, 1993, **12**:1311~1319.
- 8 Giese, K., A. Amsterdam, R. Crossen. DNA binding properties of the HMG domain of the lymphoid-specific transcriptional regulator LEF-1. *Genes Dev.*, 1991, **5**:2567~2571.
- 9 Van de wetering, M., H. Clever. Sequence-specific interaction of the HMG box protein TCF-1 and SRY occurs within the minor groove of a Watson-Crick double helix. *EMBO J.*, 1992, **11**:3039~3045.
- 10 Chih-yen, K., M. A. Weiss. The SRY high-mobility-group box recognizes DNA by partial interaction in the minor groove: A topological mechanism of sequence specificity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, **90**:11990~11993.
- 11 Natesan, S., M. Z. Gilman. DNA binding and orientation-dependent function of YY1 in the c-fos promoter. *Genes Dev.*, 1993, **7**:2497~2501.
- 12 Behringer, R. R., M. J. Finagold, R. L. Cata. Mullerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell*, 1994, **79**:415~425.
- 13 McElreavey, K., S. Barbaux, A. Ion, M. Fellous. The genetic basis of murine and human sex determination: a review. *Heredity*, 1995, **75**:599~611.