

绵羊高繁殖力候选基因类固醇 21-羟化酶 (*CYP21*) 的研究

杨志敏¹, 查丽莎², 储明星^{3*}, 陈宏权², 李碧春^{1*}, 张亚妮¹, 狄冉³, 刘秋月³

(1. 扬州大学 动物科学与技术学院, 扬州 225009; 2. 安徽农业大学动物科技学院, 合肥 230036;

3. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 农业部畜禽遗传资源与种质创新重点实验室, 北京 100193)

摘要: 通过采取 PCR-SSCP 和限制性内切酶酶切的方法检测类固醇 21-羟化酶 (steroid 21-hydroxylase, *CYP21*) 基因的 10 个外显子在高繁殖力绵羊品种 (小尾寒羊)、中等繁殖力品种 (湖羊) 和低繁殖力品种 (多赛特羊和特克塞尔羊) 间的单核苷酸多态性, 同时研究该基因对小尾寒羊高繁殖力的影响。结果显示, 在所设计的 10 对引物中, 仅引物 P8 扩增的片段存在多态性。对于 P8 扩增得到的片段, 经 *HinP I 1* 酶切后, 可在小尾寒羊、湖羊和多赛特羊中检测到 AA 和 AB 型, 而在特克塞尔羊中只检测到 AA 型; 经 *Bcn I* 酶切后, 在小尾寒羊、湖羊、多赛特和特克塞尔羊中均检测到 CC 和 CD 型。测序结果显示 AB 型与 AA 型相比在 2340 位发生了 A→G 突变, 但并未引起所编码的氨基酸发生改变; CD 型与 CC 型相比在 2376 位发生了 G→A 突变, 也未引起所编码氨基酸的变化。AB 型小尾寒羊产羔数最小二乘均值比 AA 型的多 0.96 只 ($P < 0.05$), CC 型和 CD 型小尾寒羊产羔数差异不显著 ($P > 0.05$)。研究结果初步表明 *CYP21* 基因的 B 等位基因是提高绵羊产羔数的一个候选 DNA 标记。

关键词: 绵羊; 高繁殖力; 类固醇 21-羟化酶基因 (*CYP21*); 多态性

中图分类号: S826.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)06-0937-08

Steroid 21-hydroxylase gene (*CYP21*) as a candidate gene for prolificacy of sheep

YANG Zhi-min¹, ZHA Li-sha², CHU Ming-xing³, CHEN Hong-quan²,
LI Bi-chun¹, ZHANG Ya-ni¹, DI Ran³, LIU Qiu-yue³

(1. College of Animal Science and Technology, Yangzhou University, Yangzhou 225009;

2. School of Animal Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

3. Key Laboratory of Farm Animal Genetic Resources and Germplasm Innovation of Ministry of Agriculture, Institute of Animal Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193)

Abstract: The steroid 21-hydroxylase (*CYP21*) gene was studied as a candidate gene for the high prolificacy in Small Tail Han sheep. According to the sequence of bovine *CYP21* gene, ten pairs of primers were designed to detect single nucleotide polymorphisms of exons 1-10 of *CYP21* gene in high prolificacy breed (Small Tail Han sheep), medium prolificacy breed (Hu sheep) and low prolificacy breeds (Dorset and Texel sheep) by PCR-SSCP and digestion with restriction endonucleases. Only the products amplified by primer P8 displayed polymorphisms. For primer P8, two genotypes (AA and AB) were detected in Small Tail Han, Hu and Dorset sheep by digesting the PCR products with *HinP I 1*, at the same time only one genotype (AA) was found in Texel sheep; as well, two genotypes (CC and CD) were detected in all the four sheep breeds by digesting the PCR products with *Bcn I*. Sequencing revealed one mutation (2340A→G) of *CYP21* gene in the genotype AB in comparison to the genotype AA; another mutation (2376G→A) of *CYP21* gene in the genotype CD in comparison to the genotype CC, and both of mutations did not cause any amino acid change. The Small Tail Han sheep with genotype AB had mean 0.96 ($P < 0.05$) lambs more than those with genotype AA; and there was no significant difference of the litter size between genotypes CC and CD ($P > 0.05$). These results preliminarily indicated that allele B of *CYP21* gene is a potential DNA marker for improving

收稿日期: 2013-03-27

基金项目: 国家肉羊产业技术体系专项(CARS-39), 北京市自然科学基金项目(5042017)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2010jc-9)共同资助。

作者简介: 杨志敏, 女, 硕士研究生。E-mail: weiruihuixingfu@163.com

* 通信作者: 储明星, 男, 博士, 研究员, 博士生导师。E-mail: mxchu@263.net
李碧春, 女, 博士, 教授, 博士生导师。E-mail: yubcli@yzu.edu.cn

the litter size of sheep.

Key words: sheep; prolificacy; steroid 21-hydroxylase gene; polymorphism

类固醇 21-羟化酶 (steroid 21-hydroxylase), 亦称为 cytochrome P450 subfamily 21 (CYP21), 是肾上腺类固醇激素合成调控的关键酶之一, 由 *CYP21* 基因编码。*CYP21* 基因位于人 6 号染色体短臂 (6p21.3) 的人白细胞抗原 HLA(MHC)型 Class III 区域, 由无活性的 *CYP21A*(假性基因)和有活性的 *CYP21B*(活性基因)组成, 包含 10 个外显子和 9 个内含子; 假性基因 *CYP21A* 与之相邻, 间隔 30 kb, 与编码血浆补体的 *C4* 基因组成 C4A-CYP21A-XA-C4B-CYP21B-XB 样的串联重复排列序列。活性基因和假性基因的外显子同源性高达 98%, 内含子的同源性为 95%^[1]。*CYP21* 基因突变属于人类常染色体隐性遗传疾病, 它的变异会引起 P450c21 酶活性缺失, 引发 21-羟化酶缺陷症 (21-hydroxylase deficiency, 21-OHD) 并伴随先天性肾上腺增生 (congenital adrenal hyperplasia, CAH)^[2]。CAH 患者在出生时或出生不久就出现明显的临床症状: 女婴产前男性化^[3]。引起 CAH 病症的 21-羟化酶缺乏通常会导致青春期提前, 男性表现为同性性早熟(同性性早熟是指出现同性性征的年龄过早, 男性表现为同性性早熟, 即男性提前出现性成熟现象, 比如睾丸阴囊增大、阴茎增长变粗、出现阴毛、胡须、腋毛、声音变粗且低沉、喉节变大、甚至出现阴茎勃起、排精现象等); 女性则表现出异性性早熟(异性性早熟是指过早的出现异性性征, 女性表现为异性性早熟, 即出现男性体态、阴蒂增大、喉结变大等现象, 阴毛分布如男性, 而女性性征退化, 子宫缩小等), 但由于体格发育过快, 骨骺愈合过早, 均表现出成年身材矮小伴随着皮肤黏膜色素沉着^[4-5]。21-羟化酶是肾上腺类固醇激素合成途径中的关键酶之一, 17-羟孕酮及孕酮在 21-羟化酶的作用下, 分别转化成脱氧皮质醇和脱氧皮质酮, 最终产物分别是去氧皮质醇和去氧皮质酮^[6]。17-羟孕酮、孕酮、皮质醇和醛固酮类固醇激素在调节动物的繁殖、生长及生命活动中具有重要作用^[7-8]。经过 Blast 之后发现, 人与牛的 *cyp21* 基因在 mRNA 水平的同源性为 84%, 由于该基因在不同物种之间保守性较高, 因此推测研究绵羊 *CYP21* 基因的多态性具有重要意义。

小尾寒羊和湖羊是我国独有的优质遗传资源, 具有常年发情、性早熟和产羔数多的优良特性。据《中国羊品种志》^[9]记载, 山东小尾寒羊平均产活

羔数为 2.61 只, 湖羊平均产活羔数为 2.29 只。Casas 等^[10]报道多赛特平均产活羔数为 1.45 只, 特克塞尔平均产活羔数为 1.41 只。本研究以小尾寒羊、湖羊、多赛特和特克塞尔为研究对象, 通过采用测序和单链构象多态性 (single strand conformation polymorphism, SSCP) 以及限制性内切酶酶切的方法分析 *CYP21* 基因编码区的单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP), 比较该基因在 4 个绵羊品种间的多态性以及与小尾寒羊产羔数的关系, 旨在寻找与产羔数相关的遗传标记, 为绵羊高繁殖力的标记辅助选择提供科学理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

随机选择于自 2010 年开始产羔的 247 只小尾寒羊母羊, 记录其胎次、产羔月份和产羔数, 这些小尾寒羊母羊血样采自山东省嘉祥县种羊场; 48 只多赛特母羊和 47 只特克塞尔母羊血样均采自北京高特牧业有限公司种羊场 (北京市顺义区大孙各庄镇); 45 只湖羊母羊血样采自浙江省余杭湖羊场。颈静脉采血, 所采血样均为 10 mL·只⁻¹, 用柠檬酸葡萄糖抗凝, -20℃冻存。用酚氯仿抽提法提取基因组 DNA, 溶于 TE 缓冲液 (10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.0), 1 mmol·L⁻¹ EDTA (pH 8.0)), -20℃保存。

最近没有对这些小尾寒羊的产羔数以及其它繁殖性状进行选择。这 247 只小尾寒羊母羊是 5 只公羊的后代, 其数目分别为 46、47、50、51、53 只。实际第 1 胎 ($n=80$)、第 2 胎 ($n=82$) 和第 3 胎 ($n=85$) 分别作为 3 个胎次。根据当地绵羊生产实际划分产羔季节: 产羔月份在 3~5 月的作为季节 1 (春季) ($n=63$), 在 6~8 月的作为季节 2 (夏季) ($n=55$), 在 9~11 月的作为季节 3 (秋季) ($n=72$), 在 12~2 月的作为季节 4 (冬季) ($n=57$)。

1.2 主要试剂

Taq DNA 聚合酶、dNTPs、pGM-T 载体、DNA 片段回收纯化试剂盒、质粒提取纯化试剂盒等均购自 TaKaRa 公司、北京天根生物技术有限公司和 BioMed 公司; 限制性内切酶 *Bcn* I 和 *Hin* P I 1 购于 TaKaRa 公司和 NEB 公司。

1.3 引物设计和 PCR 扩增

根据牛 *CYP21* 基因 DNA 序列 (GenBank 登录

号: NC_007324), 用 Oligo 6.0 软件分别在外显子 1~10 处各设计 1 对引物, 扩增绵羊 *CYP21* 基因的 10 个外显子, 扩增片段全长为 1 323 bp。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。引物序列、扩增区域、产物大小和退火温度见表 1。

PCR 扩增总体积均为 25 μL , 其中 $10\times$ 缓冲液 2.5 μL (不含 Mg^{2+}), 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 上下游引物各 0.5

μL , 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs 2.0 μL , 25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mg^{2+} 1.5 μL , 50 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ DNA 模板 2.0 μL , 2.5 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μL , 去离子水 15.5 μL 。扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, P1~P10 引物分别于表 1 中所示温度退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。3%的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。

表 1 绵羊 *CYP21* 基因 10 对引物序列、扩增区域、产物大小和退火温度

Table 1 The sequence, amplified region, product size and annealing temperature of ten pairs of primers of goat *CYP21* gene

引物 Primer	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	扩增区域 Amplified region	产物大小/bp Product size	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ Annealing temperature
P1	F: TGCTGCTGCTGCTCACCTGCT R: CTTGCAGCCCAAGGCGAAGCCTGT	外显子 1 Exon 1	186	60
P2	F: TGGTGGTGCTGAACTCCAAGAG R: CCCCTTACAGGATGGTATCTG	外显子 2 Exon 2	95	60
P3	F: AAGTTGGTGTCTCAGCGCTGCC R: ACCTCGCAGAACTCCTGGGTCA	外显子 3 Exon 3	155	68
P4	F: CCGTGACCATCCAGAAGGA R: AGCCTTGACCTTGTTTCC	外显子 4 Exon 4	80	53
P5	F: GCAGGAGGACACCTTAGTAC R: CACCCTGAGAAAAGGAACC	外显子 5 Exon 5	109	56
P6	F: CTGCCCCAGTTCTTCCCCAAC R: TTGTGGCGCGTCAGCTGCT	外显子 6 Exon 6	95	58
P7	F: CCAGTGGAGGGATATGACG R: ACCTCGGGGTGGTGAAGTA	外显子 7 Exon 7	186	61
P8	F: CAGATTCAGCGCCGCCTTC R: ACCTGCTAGGCCGCTGGT	外显子 8 Exon 8	184	62.2
P9	F: TCAGCATCTTCGGCTACGAC R: AACTCGTGCGGCTGCTCCCA	外显子 9 Exon 9	100	62.2
P10	F: CAGACCGTTCCTGGAGC R: GTGAAGGCCTGCAGCAGT	外显子 10 Exon 10	133	62

1.4 SSCP 分析

3 μL PCR 产物和 7 μL 变性剂 (98%甲酰胺、0.025%溴酚蓝、0.025%二甲苯氰、10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA (pH 8.0)、10%甘油) 混匀, 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min, 然后冰浴 7 min。变性后 PCR 产物在 12%非变性聚丙烯酰胺: 甲叉双丙烯酰胺 (29:1) 凝胶中常温电泳过夜, 电泳结束后, 银染显带。用凝胶成像仪 AlphaImagerTM 2200 and 1220 Documentation and Analysis Systems (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA) 分析。

1.5 SNPs 位点测定及分型

对 10 对引物进行扩增, 并进行 SSCP 粗略筛选寻找 SNP 位点, 挑取不同带型个体进行 PCR 扩增, PCR 回收产物送北京三博远志生物技术有限责任公司测序。对测序结果进行比对以确定 SNP 位点。

1.6 PCR 产物酶切及基因分型

Bcn I 酶切的反应体系为 10 μL : PCR 扩增产物

5 μL , 限制性内切酶 0.5 μL , $10\times$ 缓冲液 1 μL , BSA 1 μL , 加超纯水至 10 μL ; *Hin*P I 1 酶切的反应体系为 10 μL : PCR 扩增产物 5 μL , 限制性内切酶 0.35 μL , $10\times$ 缓冲液 1 μL , 加超纯水至 10 μL 。*Bcn* I、*Hin*P I 1 均用 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜消化, 3%琼脂糖凝胶电泳检测, 用凝胶成像仪 AlphaImagerTM 2200 and 1220 Documentation and Analysis Systems (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, CA, USA) 拍照和分析, 统计基因型。

1.7 统计分析

配合下列模型进行最小二乘方差分析, 比较小尾寒羊产羔数在引物 P8 不同基因型之间的差异:

$$y_{ijklm} = \mu + S_i + LS_j + P_k + G_l + e_{ijklm}$$

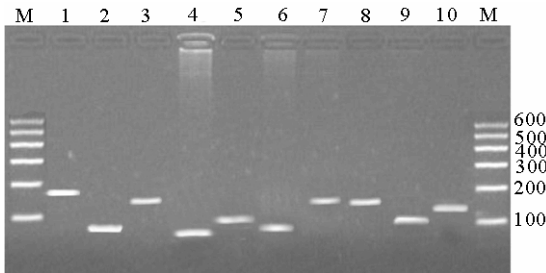
其中: y_{ijklm} 为产羔数的记录值; μ 为群体均值; S_i 为第 i 只公羊的固定效应, $i=1, 2, 3, 4, 5$; LS_j 为第 j 个产羔季节的固定效应, $j=1, 2, 3, 4$; P_k 为第 k 个胎次的固定效应, $k=1, 2, 3$; G_l 为第 1

种基因型的固定效应, $l=1, 2; e_{ijklm}$ 为随机残差效应。用 SAS (V8.12) 的 GLM (General Linear Model) 过程完成。

2 结果与分析

2.1 P1~P10 的 PCR 扩增

所设计的 10 对引物都获得了特异性的 PCR 扩增产物, 片段长度大小与预期一致, 且没有非特异性扩增条带, 可以直接进行 SSCP 分析。引物 P1~P10 的扩增结果见图 1。



Lanes 1 to 10 represent PCR products of ten pairs of primers respectively; M: DNA marker I

图 1 10 对引物的 PCR 产物

Figure 1 PCR products of ten pairs of primers

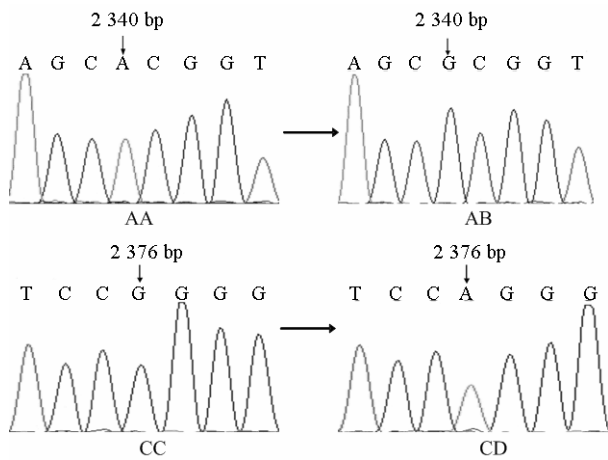


图 2 绵羊 CYP21 基因的 2 个 SNP 位点

Figure 2 Two SNPs of CYP21 gene in sheep

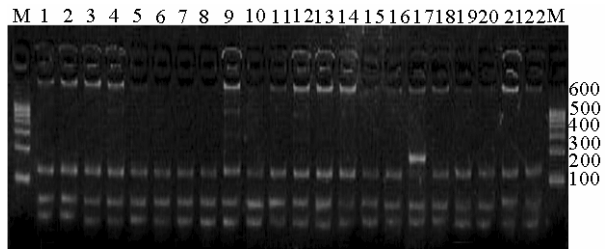
2.2 SSCP 检测及序列分析

对 10 对引物扩增的 PCR 产物分别进行 SSCP 分析, 结果发现仅引物 P8 扩增片段有多态性, 回收不同带型个体的 PCR 扩增产物送北京三博远志生物技术有限责任公司测序。为消除测序错误, 保证碱基序列正确, 每种带型个体各测 3 个样并重测 1 次。测序结果 (图 2) 与牛 CYP21 相应序列

(NM_001013596) 相比), 第 2 340 bp 处 A→G 的突变导致 *HinP I* 酶切多态位点的产生, 没有导致氨基酸变化; 第 2 376 bp 处 G→A 的突变导致 *Bcn I* 酶切多态位点的产生, 也没有引起氨基酸变化;

2.3 多态位点酶切检测

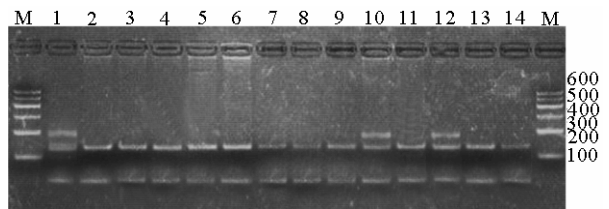
2.3.1 CYP21 基因外显子 A2340G 位点 *HinP I* 酶切 A2340G 位点 *HinP I* 酶切的 PCR 扩增产物为 184 bp, 根据电泳图和测序结果综合分析, 共有 2 种基因型: AA(117/57/10 bp)和 AB(184/117/57/10 bp), 结果见图 3。



M: DNA marker I

图 3 3%琼脂糖凝胶分析 A2340G 位点 *HinP I* 酶切 *HinP I* -RFLP patterns of PCR products of A2340G site in 3% agarose gel; Maker, DNA Marker I

2.3.2 CYP21 基因外显子 G2376A 位点 *Bcn I* 酶切 G2376A 位点经 *Bcn I* 酶切的 PCR 扩增产物大小为 184 bp, 根据电泳图和测序结果综合分析, 共有 2 种基因型: CC(137/47bp)和 CD(184/137/47 bp), 结果见图 4。



M: DNA marker I

图 4 3%琼脂糖凝胶分析 G2376A 位点 *Bcn I* 酶切 *Bcn I* -RFLP patterns of PCR products of G2376A site in 3% agarose gel; Maker, DNA Marker I

2.4 CYP21 基因在不同绵羊品种中的遗传多态性

以 4 个绵羊品种基因型检测结果为依据, 计算小尾寒羊、湖羊、多赛特和特克塞尔 4 个绵羊品种的基因型频率和等位基因频率, 统计结果见表 2。

由表 2 可见, 对于 P8 扩增片段, *HinP I* 酶切在小尾寒羊、湖羊和多赛特中检测到 AA 和 AB 型, 在特克塞尔中只检测到 AA 型; *Bcn I* 酶切在小尾寒

羊、湖羊、多赛特和特克塞尔中均检测到 CC 和 CD 型。高繁殖力的小尾寒羊 B 等位基因频率为 0.494, 中等繁殖力的湖羊 B 等位基因频率为 0.200, 低繁殖力的多赛特和特克塞尔 B 等位基因频率分别为 0.010 和 0.000; 对应的 D 等位基因频率分别为 0.017、0.056、0.062 和 0.138。

表 2 4 个绵羊品种 *CYP21* 基因酶切结果的等位基因频率和基因型频率

Table 2 Allele and genotype frequencies of *CYP21* gene in four sheep breeds by digesting the PCR products with restriction endonucleases

品种 Breed		小尾寒羊 Small Tail Han Sheep	湖羊 Hu sheep	多赛特 Dorset sheep	特克塞尔 Texel sheep	
<i>HinP</i> I 1	数量 Number	247	45	48	46	
	基因型频率	AA	0.012 (3)	0.600 (27)	0.979 (47)	1.000 (46)
	Genotype frequency	AB	0.988 (244)	0.400 (18)	0.021 (1)	0.000 (0)
		BB	0.000 (0)	0.000 (0)	0.000 (0)	0.000 (0)
	等位基因频率	A	0.506	0.800	0.990	1.000
Allele frequency	B	0.494	0.200	0.010	0.000	
<i>Bcn</i> I	数量 Number	230	45	32	47	
	基因型频率	CC	0.965 (222)	0.889 (40)	0.875 (28)	0.723 (34)
	Genotype frequency	CD	0.035 (8)	0.111 (5)	0.125 (4)	0.277 (13)
		DD	0.000 (0)	0.000 (0)	0.000 (0)	0.000 (0)
	等位基因频率	C	0.983	0.944	0.938	0.862
Allele frequency	D	0.017	0.056	0.062	0.138	

注: 括号内的数字是个体数。

Note: The numbers in the brackets are the individuals that belong to the respective genotypes.

表 3 *CYP21* 基因不同基因型小尾寒羊产羔数的最小二乘均值及标准误

Table 3 Least squares mean and standard error for litter size of different genotypes of *CYP21* gene in Small Tail Han sheep

引物 Primer	限制性内切酶 Restriction endonuclease	基因型 Genotype	母羊数 Number of ewes	产羔数 Litter size
P8	<i>HinP</i> I 1	AA	3	1.16 ^b ±0.14
		AB	244	2.12 ^a ±0.05
	<i>Bcn</i> I	CC	222	2.01 ^a ±0.06
		CD	8	1.98 ^a ±0.16

注: 同一位点具有相同字母肩标的平均值间差异不显著($P>0.05$), 具有不同字母肩标的平均值间差异显著($P<0.05$)。

Note: For the same locus, least squares means with the same superscript have no significant difference ($P>0.05$), and least squares means with the different superscripts differ significantly ($P<0.05$).

2.5 固定效应对小尾寒羊产羔数的影响

对于 P8 扩增片段, 方差分析结果表明公羊、产羔季节、胎次对小尾寒羊产羔数都有显著性影响 (均为 $P<0.05$)。 *CYP21* 基因不同基因型的小尾寒羊产羔数的最小二乘均值及标准误见表 3。

由表 3 可知, AB 型小尾寒羊产羔数最小二乘均值比 AA 型的多 0.96 只 ($P<0.05$); CC 型和 CD 型之间差异不显著 ($P>0.05$)。

3 讨论

3.1 *CYP21* 基因多态性

MHC 是迄今为止发现在哺乳动物中表现最复杂的多态性遗传系统, 它的每一位点都存在数量甚多的共显性等位基因, 在群体中表现出极为复杂的

多态性^[11], 其中在人^[12]、猪^[13-14]、牛^[15]和马^[16]的 *CYP21* 基因位点的研究中已证实存在多态性。迄今为止, 已经发现的点突变有 80 个, 其中大约 75% 的突变是在等位基因 A 中发现的, 由此推断它是在有丝分裂过程中通过基因转换被转移到 *CYP21* 基因内部^[17]。Krone 等^[18]通过酶切的方法在失盐型 CAH 患者中检测到了 *CYP21* 基因的 141delT 突变, 该突变导致位于 51 (L51X)氨基酸位点的截短蛋白早熟终止, 而该蛋白可直接导致 *CYP21* 酶的失活; Weintrob 等^[19]在研究以色列 21-羟化酶缺陷症 (21-hydroxylase deficiency, 21-OHD) 患者时发现了 *CYP21* 基因外显子 8 上的 Q318X 突变以及外显子 4 的 I172N 突变; Levo 和 Partanen^[20]在 *CYP21* 基因第 7 外显子上发现了与单倍体 HLA A3 B44 BfS

C4A3 C4B1 DRB1 *04 有关的突变位点 W302X; Dolzan 等^[21]在中欧的 CAH 患者的 *CYP21* 基因中检测出 N493S 的突变; Yulia 等^[22]在对 100 多位经典 CAH 患者的研究中发现 4 个 *CYP21* 基因多态位点, 分别为: g.989T>C、g.1016G>A、g.1746T>C 和 g.2497C>T; Krone 等^[23]对罹患单纯男性化症状的 CAH 患者进行研究并在 *CYP21* 基因上检测到 I77T 和 A434V2 个突变位点, 且 Krone 认为 I77T 突变可显著减少反应产物的释放并阻止 21-羟化酶酶解物进入酶的活性区域, 而 A434V 不但可以降低 21-羟化酶催化能力, 还可以减慢催化速度。Moran 等^[24]提出利用第 7 外显子上 V287L 是最常见的突变做基因分型, 证实利用显著异常增加的基础水平或 ACTH-刺激 17-羟孕酮分泌量的变化从内分泌水平上诊断出 21-OH 羟化酶障碍 (Nonclassic adrenal hyperplasia, NACH), 但由于 *CYP21* 复杂的位置以及稀有突变导致它功能突变分析愈加复杂。Qin 等^[25]在进行疾病与生殖关联深入研究时, 利用绵羊的 BAC 文库和 cosmid 基因组文库构建覆盖约 700 kb MHC 第 III 区的物理图谱发现了 10 个 SNP 位点, 并且发现绵羊的 MHC 的 III 区基因分布与人类该区相似, 尽管在 C4 和 *CYP21A/B* 位点发生了倒置重复产生了明显的点突变。

截止到目前为止, 有关绵羊 *CYP21* 基因位点的多态性功能研究还未见报道。本研究首次针对绵羊 *CYP21* 基因设计了 10 对引物, 且在第 8 外显子上发现了多态位点。

3.2 *CYP21* 基因突变原因

Paola 等^[26]在分析导致 *CYP21* 基因突变的原因时发现, 主要是一些序列从 *CYP21A* 到 *CYP21B* 之间的转换, 从而影响着功能基因的活性。研究发现, 大约 95% 的 *CYP21* 突变是由于活性基因与假性基因之间的转换引起的基因功能损失, 突变包括以下几个方面^[27]: (1) 基因缺失: 约占 15%, 缺失常覆盖 *CYP21A* 基因、*C4B* 基因及 *CYP21B* 基因的第 1~第 6 个外显子区域, 范围可达 30 kb, 从而使功能基因失去编码活性 21-OH 的功能, 且缺失片段大小不同对酶活性影响也不同。(2) 基因转换: 基因转换是一种同源序列之间非交互性的遗传信息交换, 是基因组中一个特定基因库的等位基因序列内部的部分或全部序列被其它等位基因或基因座拷贝的同源片段所替代, 而供体本身的基因序列不变。基因转换在 *CYP21* 基因缺陷中发生率较高, 这主要由于 *CYP21* 处于 *HLA* 基因复合体内部, 而 *HLA* 基因簇是人类最活跃的区域, 重组发生率高, 基因型多样

化造成的。基因转换的结果常常是将 *CYP21A* 的序列转化到 *CYP21B* 上, 使其功能改变。大片的基因转换通常使 *CYP21B* 基因完全失去编码功能或使蛋白质严重失活, 约占突变的 10%; 微小基因转换对酶活性的影响据其突变位点和作用而不同, 约占 70%。微小基因转化的作用机制主要有以下几个方面: ①剪接突变: 由于剪接位点改变, 从而造成阅读框架的严重改变, 妨碍活性蛋白质的合成, 如 I2 splice。②错义突变: 由于密码子的改变, 导致氨基酸类型的改变, 从而引起酶空间活性构象的改变。如 Ile173Asn。③无义突变: 由于核苷酸的改变, 提前形成终止子, 使翻译提前终止, 产生截断蛋白, 使酶活性丧失。如 Gln319stop。(3) 其余 5% 的患者等位基因含有特别的突变, 这些突变并不是由于真假基因相互作用所引起, 它们代表了个别人群中的稀有等位基因^[28]。还有一些是不影响基因功能的自发突变。

3.3 *CYP21* 基因与繁殖的关系

21-羟化酶是肾上腺类固醇合成所必需的 5 种关键酶 (3 β -羟脱氢酶(3 β -HSD)、17 α -羟化酶、17~20 侧链酶和 11-羟化酶, 皆属于细胞色素 P450 簇氧化酶的成员) 之一, 醛固酮的合成需要 3 β HSD、P45021、P45011 来催化。*CYP21* 基因的突变将导致 21-羟化酶的缺乏, 从而影响醛固酮, 皮质醇和性激素的合成^[29], 而酶缺乏的结果之一引起糖皮质激素和盐皮质激素合成途径的终产物不足, 其中皮质醇缺乏可反馈引起垂体 ACTH 分泌增多, 刺激肾上腺皮质增生, 引发皮肤、乳晕、外生殖器色素沉着, 再者会导致皮质激素生物合成途径的中间产物 (17 α 孕烯醇酮、17 α 羟孕酮) 堆积, 大量堆积的中间产物势必产生大量的脱氢异雄酮及雄烯二酮, 造成人体内雄性激素异常增高。脱氢异雄酮可促进骨骼的生长, 促进毛发特别是阴毛、腋毛的增生及阴茎、阴蒂的发育, 最终导致男性发生同性性早熟, 女性则为异性性早熟^[30]。Nayak^[31]发现 *CYP21* 基因的 E318X (X 代表终止密码子) 突变与儿童阴毛提前出现和雄激素过多症有关; 最近的研究表明, 胰岛素受体底物蛋白 I 基因的 G972R 变异, 在 *CYP21* 突变的杂合子女性携带者中可能是一个修饰位点, 能增加多囊卵巢综合症 (PCOS) 患者肾上腺源性雄激素分泌过多的风险, 故而 *CYP21* 基因改变还与 PCOS 具有一定的相关性^[32]。相对于轻微 *CYP21* 患者而言, 严重患者的妊娠时间更长, 意味着过量的雄激素会增加 17-羟孕酮含量或引起皮质醇缺乏或者是共同作用于这些引起妊娠时间延长的因素^[33]。

本研究发现的 A2340G 突变虽然为同义突变, 没有引起氨基酸的变化, 但其可能是由于同一氨基酸对简并密码子翻译效率不同, 或转录水平差异而导致蛋白质表达量上改变, 进而影响繁殖性能^[34]。酶切分型之后发现, 没有 BB 和 DD 基因型, 原因可能是由于 *CYP21* 基因位于重组概率最高的 HLA 基因复合物中, 当发生大片段的重组时, *CYP21* 基因失活, 可能会使个体在胚胎时期死亡, 或者是在长期自然选择中被淘汰, 也有可能是由于此次检测样本数量不大。结果初步显示 *CYP21* 基因的 B 等位基因是提高绵羊产羔数的一个潜在有效的 DNA 标记。由于本研究检测的 *HLA* 基因容易发生品种数和样本数较少, 小尾寒羊数目明显多于其他 3 种绵羊品种, 这对本次试验中所得出的结论也会造成一定影响, 因此所获得的结论只是初步的, 值得继续增加绵羊品种数、扩大样本数、进行标记与产羔性能的关联做更加深入的研究。

参考文献:

- [1] Higashi Y, Yoshioka H, Yamane M, et al. Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986, 83(9):2841-2845.
- [2] Speiser P W, White P C. Congenital adrenal hyperplasia[J]. New England Journal of Medicine, 2003, 349:776-788.
- [3] Moran C, Azziz R, Weintrob N, et al. Reproductive outcome of women with 21-hydroxylase-deficient nonclassical adrenal hyperplasia[J]. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2006, 91(9): 3451-3456.
- [4] Kalantaridou S N and Chrousos G P. Clinical review 148: Monogenic disorders of puberty[J]. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2002, 87(6): 2481-2494.
- [5] Merke D P, Bornstein S R, Avila N A, et al. NIH conference. Future directions in the study and management of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency[J]. Annals of Internal Medicine, 2002, 136(4): 320-334.
- [6] 愈霭峰. 妇产科内分泌学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1983: 313-327.
- [7] Miller W L, Morel Y. The molecular genetics of 21-hydroxylase deficiency[J]. Annual Review of Genetics, 1989, 23: 371-393.
- [8] Geffrotin C, Chardon P, de Andres-Cara D F, et al. The swine steroid 21 hydroxylase gene (*CYP21*): Cloning and mapping within the swine leucocyte antigen complex[J]. Animal Genetics, 1990, 21(1): 1-13.
- [9] 《中国羊品种志》编写组. 中国羊品种志[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1989: 50-52; 55-58.
- [10] Casas E, Freking B A, Leymaster K A. Evaluation of Dorset, Finnsheep, Romanov, Texel and Montadale breeds of sheep: II. Reproduction of F₁ ewes in fall mating seasons[J]. Animal Science, 2004, 82(5): 1280-1289.
- [11] 储明星, 冯涛, 狄冉, 等. 哺乳动物性早熟相关基因的研究进展[J]. 遗传, 2009, 31(1): 13-28.
- [12] Miller W, Morel Y. The molecular genetics of 21-hydroxylase deficiency[J]. Annual Review of Genetics, 1989, 23(1): 371-393.
- [13] Geffrotin C, Renard C, Chardon P, et al. Marked genetic polymorphism of the swine steroid 21-hydroxylase gene, and its location between the SLA class I and class II regions[J]. Animal Genetics, 1991, 22(4): 311-322.
- [14] Kmiec M, Ziemak J, Dybus A, et al. Analysis of relations between polymorphism in steroid 21-hydroxylase gene (*CYP21*) and quantitative and qualitative characters of boar semen[J]. Czech Journal of Animal Science, 2002, 47(5): 194-199.
- [15] Teilmann J L, Skow L C, Womack J E. Restriction fragment length polymorphisms for growth hormone, prolactin, osteonectin, α crystalline, γ crystallin, fibronectin and 21-steroid hydroxylase in cattle[J]. Animal Genetics, 1989, 20(1): 257-266.
- [16] Kay P H, Dawkins R L, Bowling A T, et al. Heterogeneity and linkage of equine C4 and steroid 21-hydroxylase genes[J]. International Journal of Immunogenetics, 1987, 14(4-5): 247-253.
- [17] Regina W, Zuzana P, Regina B, et al. Mutational analysis of *CYP21* gene in Slovak patients with 21-hydroxylase deficiency and comparison with other European populations[J]. Biologia, 2004, 59(6): 795-802.
- [18] Krone N, Riepe F G, Grotzinger J, et al. Functional characterization of two novel point mutations in the *CYP21* gene causing simple virilizing forms of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency[J]. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2005, 90(1): 445-454.
- [19] Weintrob N, Brautbar C, Pertzalan A, et al. Genotype-phenotype associations in non-classical steroid 21-hydroxylase deficiency[J]. European Journal of Endocrinology, 2000, 143(3): 397-403.
- [20] Levo A, Partanen J. Novel Nonsense mutation (W302X) in the steroid 21-hydroxylase gene of a Finnish patient with the salt-wasting form of congenital adrenal hyperplasia[J]. Human Mutation, 1997, 9(4): 363-365.
- [21] Dolzan V, Sólyom J, Fekete G, et al. Mutational spectrum of steroid 21-hydroxylase and the genotype-phenotype association in Middle European patients with congenital adrenal hyperplasia[J]. European Journal of Endocrinology, 2005, 153(1): 99-106.
- [22] Yulia G, Petr R, Felix G R, et al. Four novel missense mutations in the *CYP21A2* gene detected in Russian patients suffering from the classical form of congenital adrenal hyperplasia (CAH): identification, functional characterization and structural analysis[J]. The Journal of Clinical Endocrinology, 2006, 91(12): 4976-4980.
- [23] Krone N, Braun A, Roscher A A, et al. A novel frame shift mutation (141delT) in exon 1 of the 21-hydroxylase gene (*CYP21*) in a patient with the salt wasting form of congenital adrenal hyperplasia[J]. Human Mutation, 1999,

- 14(1): 90-91.
- [24] Moran C, Azziz R, Weintrob N, et al. Reproductive Outcome of Women with 21-Hydroxylase-Deficient Non-classic Adrenal Hyperplasia[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2006, 91(9): 3451-3456.
- [25] Qin J, Mamotte C, Cockett N E, et al. A map of the class III region of the sheep major histocompatibility complex[J]. *BMC Genomics*, 2008, 9:409.
- [26] Concolino P, Mello E, Zuppi C, et al. Molecular diagnosis of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: an update of new CYP21A2 mutations [J]. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2010, 48(8): 1057-1062.
- [27] Wedell A. Molecular approaches for the diagnosis of 21-hydroxylase deficiency and congenital adrenal hyperplasia[J]. *Clinics in Laboratory Medicine*, 1996, 16(1): 125-137.
- [28] Concolino P, Mello E, Zuppi C, et al. CYP21A2p.E238 deletion as result of multiple microconversion events: A genetic study on an Italian congenital adrenal hyperplasia(CAH)family[J]. *Diagnostic Molecular Pathology: the American Journal of Surgical Pathology, Part B*, 2013, 22(1): 48-51.
- [29] 薛志新, 王德芬, 赵寿民. 21 羟化酶缺乏症基因研究和诊断、治疗的新进展[J]. *国外医学.遗传学分册*, 1998, 21(6): 317-322.
- [30] 李嫔. 性早熟病因及发病机制的研究进展[J]. *实用儿科临床杂志*, 2005, 20(6): 499-500.
- [31] Nayak S, Lee P A, Witch S F. Variants of the type 2 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene in children with premature pubic hair and hyperandrogenic adolescents[J]. *Molecular Genetics and Metabolism*, 1998, 64(3): 184-192.
- [32] Witchel S F, Kahsar-Miller M, Aston C E, et al. Prevalence of CYP21 mutations and IRS1 variant among women with polycystic ovary syndrome and adrenal androgen excess[J]. *Fertil Steril*, 2005, 83(2): 371-375.
- [33] Gidlöf S, Wedell A, Nordenström A. Gestational age correlates to genotype in girls with CYP21 deficiency[J]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2007, 92(1): 246-249.
- [34] 吴宣福, 何玉琴, 张现伟, 等. 家族性偏头痛家系中发现的 CACN1A 基因同义突变[J]. *中国神经精神疾病杂志*, 2008, 34(5): 296-299.