基础研究 文章编号:0253-3626(2010)06-0853-04

SHOX 基因异常及其表型特征的研究

曹艳丽,朱 岷,解 芳,熊 丰
(重庆医科大学附属儿童医院内分泌科,重庆 400014)

【摘 要】目的:研究矮小患者中矮小同源盒(Short stature homeobox containing,SHOX)基因的异常及与表型之间的关系。方法:采用微卫星分析及外显子测序对 203 例矮小症患者进行基因分析,并测量体征,收集其左前臂正位及左腕部正位 X 片,观察表型特征。结果:203 例矮小患者中 1 例外显子突变,11 例缺失;体征测量示 SHOX 异常引起某些体征异常,如短前臂和短下肢等。结论:本研究所选矮小患者的 SHOX 异常的频率是 5.9%,发现基因异常与表型之间的具有某些相关性。

【关键词】矮小同源盒基因;特发性矮小;表型
【中国图书分类法分类号】R725.8 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-01-26

Study on the deletions of SHOX gene and the correlation with corresponding phenotypes

CAO Yan-li, et al
(*Department of Endocrinology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the deficiency of short stature homeobox containing (SHOX) gene deficiency of short stature and the relationship between genotypes and its corresponding phenotypes. *Methods*: Microsatellite analysis and direct sequencing were selected to analyze the deletions and mutations of SHOX gene in 203 cases of short stature; in addition, anthropometric measures were assessed and radiographs of the left forearms and wrists in patients were collected to observe their phenotypes. *Results*: one mutation and eleven deletions were found; Detailed examination revealed certain dysmorphics, such as short forearm and lower leg, et al. *Conclusion*: In our study, the prevalence of SHOX deficiency in patients with short stature was 5.9%, and certain correlations had been found between genotypes and corresponding phenotypes.

【Key words】Short stature homeobox containing gene; Idiopathic short stature; Phenotypes

人体生长发育是多因素、多基因相互作用的复杂过程,其中基因因素尤为重要。人群矮小症的患病率为 2%,矮小同源盒基因 (Short stature homeobox containing gene,SHOX)[1,2] 是致矮小的主要基因之一。

SHOX 基因位于 X、Y 的拟常染色体区域(Pseudoautosomal region PAR1),分别编码 292 和 225 个氨基酸组成的 2 种蛋白:SHOXa 和 SHOXb。SHOX 基因主要在四肢骨表达,尤其是尺骨、桡骨、腕骨、胫、腓骨远端骨骺,促进四肢骨远端软骨细胞分化,调节软骨细胞增殖与凋亡间平衡,并抑制雌激素加速生长板成熟,利于骨发育和身体生长。SHOX 基因的纯合性缺陷导致严重的矮小,即少见的 Langer 肢中部骨发育不良(Langer mesomelic dysplasia)[3]。SHOX 基因异常多为杂合性缺陷,导致 Léri-Weill 软骨骨生成障碍和特发性矮小(Idiopathic short stature,ISS),表现为:不同程度的矮小;肢中部发育不良即前臂和小腿短;肘外翻;马德隆畸形;短掌骨、短趾骨和高颚弓等[4]。马德隆畸形是 Léri-Weill 软骨骨生成障碍的典型特征:桡骨粗短弯曲,腕骨角减小,尺桡骨远端相对侧骨骺及干骺端发育差,远端关节面向掌、尺侧倾斜,桡骨远端关节面尺侧倾斜导致腕骨尺侧移位,远侧尺桡关节脱位等。

SHOX 缺陷病人具有明显的表型异质性[5]。表现为不同程度的矮小,儿童早期身高甚至可在正常范围内;从几乎不能检测出的骨骼缺陷到严重影响病人生活的肢体畸形,骨骼的畸形程度不一。儿童早期和轻者骨骼改变不明显,可能被诊断为 ISS,而有些患者骨骼改变类似于马德隆畸形,但改变较轻不足以诊断为马德隆畸形,因此无马德隆畸形也不能排除 SHOX 缺陷。SHOX 基因的同种突变又可导致不同的表现型。且 SHOX 基因突变所致的表型又受年龄、性别影响。研究者们做了大量研究,致力于定位具体的 SHOX 基因突变与表型之间的关系,但至今未能完全解决。

SHOX 基因突变的频率因种族和人群的不同而各异,国外研究报道,ISS 中 SHOX 异常的检出率为 1.5%~14%[6-9],这远高于软骨发育不全和生长激素缺乏的总频率。而国内尚无有关该基因突变频率的报道。因此本研究以矮小儿童为研究

作者介绍:曹艳丽(1981-),女,硕士,
研究方向:小儿内分泌。
通讯作者:朱 岷,女,副教授,E-mail:zhumin323@hotmail.com。
基金项目:《中国实用儿科学杂志》金赛儿科内分泌中青年医师科研基金(编号:200905005)。

对象，调查矮小儿童 SHOX 缺陷情况，根据其体征和骨骼改变，比较 SHOX 异常人群与无 SHOX 异常的矮小儿童之间的差异，分析 SHOX 缺陷与其表型之间的相关性。

1 对象与方法

1.1 患者及标本收集

2008 年 7 月至 2009 年 10 月从重庆医科大学附属儿童医院门诊收集以矮小就诊的患者。筛选标准：①无宫内发育迟缓；②无慢性疾病；③无心理、情感障碍；④染色体检查正常；⑤GH 激发试验除外生长激素缺乏症，T3、T4、TSH 正常；⑥排除软骨发育低下等骨骼疾病。身高标准参照《中国儿科杂志》2009 年 7 月第 7 期《中国 0~18 岁儿童、青少年身高、体重的标准化生长曲线》。有报道表明在青春期前或者青春早期时，某些 SHOX 异常的儿童身高可能≥2s，故我们纳入 SHOX 筛查的标准是患者身高<-1s，家族中有成年男性身高<160 cm，成年女性身高<150 cm。共收集矮小儿童 203 例，其中男 109 例，女 94 例，平均年龄（10.01 ± 3.17）岁，其身高标准差范围是 -2.4 ± 1.1s。征得病人和家长的同意后，抽取 3 ml 抗凝血；收集身高正常儿童的血液 70 例为对照。

体征的测量包括：坐高、臂展、前臂长、小腿长、身高，比较 SHOX 异常组矮小儿童与 SHOX 无异常组矮小者的身高、坐高/身高、臂展/身高、前臂长/身高、小腿长/身高有无差异。

收集矮小患者的左前臂正位和左腕部 X 线正位片，测量下述指标：①垂高/弦长，反映桡骨的弯曲程度，桡骨弦长是指桡骨骨干突出弧度之长，桡骨垂高指桡骨骨干弧度最突出点至弦长垂线（如图 1）；②腕尺距离比，反映腕骨尺侧移位程度，腕尺距离 L_2 是尺骨纵轴线到腕关节旋转轴的距离，腕尺距离比是指 L_2 与第 3 掌骨长度 L_1 之比，如图 2。桡骨弯曲时，垂高/弦长增大，腕骨尺侧移位时腕尺距离比减小。分别比较 SHOX 异常组与无异常组之间这两个比值有无差别。

统计软件采用 SPSS17.0，两组间比较用 t 检验法，检验效值 P=0.05。为排除年龄和性别的影响，SHOX 无异常组选择与 SHOX 异常组的年龄和性别构成比均相同。

1.2 DNA 提取

用 EDTA 抗凝血，15 000 r 离心 5 min 后弃去血浆，离心柱法提取病人和正常对照组的基因组 DNA。

1.3 多聚酶链反应（Polymerase chain reaction，PCR）

5 对微卫星 PCR 扩增的上、下游引物分别为：CASHOX GACACAGAAATCCTTCATAAA，CATGTCATATATATATGTGATCC；DXYS233：TGATTTCCATCCTGGGGT，TGGGAATTCGAGGCTG；DXYS10092：CAACTTCCTTGGAAATCTTC，GCCCGTGATCCCAGTACTG；DXYS10093：AATACCCCACCATGCAAACT，GCTCCCTGAAAAACATAACG；DXYS234：TGATTTC-CATCCTGGGGT，TGGGAATTCGAGGCT。PCR 扩增利用 TIANGEN Tap 酶，其中 10 × Tap Buffer 中含 200 mmol/L Tris- HCl（pH 8.4）；200 mmol/L KCl；100 mmol/L $(NH_4)_2SO_4$，15 mmol/L $MgCl_2$。94℃变性，72℃延伸，扩增 27~30 循环。

1.4 微卫星分析

配制 8%、38:2 的聚丙烯酰胺凝胶，将 2 μl PCR 产物与等体积的甲酰胺上样缓冲液混匀，微量加样器每孔中加样 3 μl，95℃变性 5 min 后立即冰浴 10 min，180 V 电压下电泳，剥胶银染。染色液配方：0.5 g $AgNO_3$，加双蒸水定容至 500 ml；显色液配方：10 g NaOH，0.2g Na_2CO_3，2 ml 甲醛，加双蒸水定容至 500 ml。银染 8 ~ 10 min，显色 2~3 min，带显后立即置于双蒸水中终止显色。凝胶成像仪上观测结果。

1.5 外显子的 PCR 扩增

外显子 PCR 扩增的上下游引物分别为：Exon2：GAGACGCGCGCATCCACCA，GAGGCGCCGAACCCCAGGAG；Exon3：GCCACGTTGCGCAAAACCTC，CCCGAGGACCAGGCGATG；Exon4-5：TCTCTCTCTGCTTCTCCCCA，CAGGTCCCTAGGGATCTTCA；Exon6a：TTCACCATGTTAGCCAGGAA，ATCACCTGAGGTCAGGAGTT。选用 TIANGEN Hot Master Tap DNA 酶，94℃变性，72℃延伸，扩增 25~30 循环。

1.6 外显子测序

将外显子的扩增产物送重庆医科大学测序中心进行测序（ABI 3100 DNA 测序仪）。

2 结 果

本研究共收集矮小儿童 203 例，男 109 例，女 94 例。用微卫星分析寻找可能存在的 SHOX 缺失，外显子直接测序寻找可能存在的 SHOX 突变。

2.1 SHOX 缺失

微卫星分析示缺失者 11 例（缺失如图 3），包括女 6 例，男 5 例。

2.2 SHOX 突变

测序结果经 BLAST 比较，只发现 1 例突变，外显子 2：115 T→G（如图 4，箭头所指出处），氨基酸缬氨酸替代亮氨酸。

2.3 SHOX 缺失和突变的骨骼特征（见表 1）

测量左前臂及左腕部 X 线正位片，SHOX 异常组与无异常组的垂高/弦长分别为 0.031 ± 0.01 和 0.032 ± 0.02，P>0.05；SHOX 异常组与无异常组的腕尺距离比 0.30 ± 0.05 及 0.31 ± 0.05，P>0.05；差异无统计学意义。

2.4 SHOX 异常的表型特征

SHOX 异常组共有 12 例，5 例男性，7 例女性，平均年龄



图 1 垂高/弦长



图 2 腕尺距离比：L_2/L_1

（9.1 ± 3.02）岁，SHOX 无异常组的年龄和性别构成比与SHOX 异常组相同，故 SHOX 无异常组共选择 36 例，其中男 15 例，女 21 例，平均年龄（9.1 ± 3.02）岁。t 检验法比较 SHOX 异常与无异常组之间坐高/身高、臂展/身高、前臂长/身高、小腿长/身高的差异，发现都有 $P<0.05$，有统计学显著差异（表 2），即 SHOX 异常者坐高/身高增大，臂展/身高、前臂长/身高、小腿长/身高都减小，有 SHOX 异常者前臂和下肢短小。而两组人群的身高无统计学差异（$P>0.05$），差异无统计学意义。



图 3　微卫星缺失

3　讨　论

SHOX 异常为拟常染色体显性遗传，本研究收集矮小患者 203 例，其中男 109 例，女 94 例。微卫星分析及外显子测序发现 SHOX 基因异常 12 例（5.9%）（男 5 例，女 7 例），包括 11 例缺失，1 例点突变。基因缺失明显多于突变，这可能与 SHOX 基因周围散在分布大量的重复序列有关[10]。本研究中

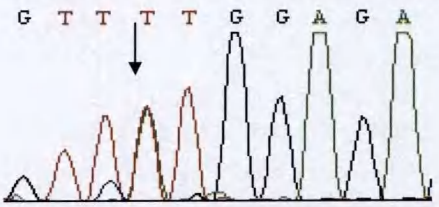


图 4　外显子 2 的突变

表 1　SHOX 异常儿童的骨骼改变

先证者	SHOX 异常	性别	年龄（岁）	骨骼改变
先证者 1	CASHOX 缺失	女	10.2	桡骨弯曲，前臂短
先证者 2	CASHOX 缺失	男	4	无骨骼改变
先证者 3	CASHOX 缺失	女	7.6	无骨骼改变
先证者 4	DXYS10092 缺失	女	12.4	腕骨角减小，第四掌骨短小
先证者 5	DXYS10092 缺失	男	14.5	桡骨骨骺三角形
先证者 6	DXYS10092 缺失	女	12.4	第四掌骨短小
先证者 7	DXYS10093 缺失	女	4.8	第四掌骨短小，桡尺间隙增大
先证者 8	DXYS10093 缺失	男	8.2	无骨骼改变
先证者 9	DXYS 233 缺失	男	9.8	尺桡骨远端相对侧骨骺发育差
先证者 10	DXYS 233 缺失	男	8.6	桡骨骨骺三角形
先证者 11	DXYS 234 缺失	女	11	桡骨骨骺轻微三角形改变
先证者 12	外显子突变	男	10	桡骨弯曲

表 2　体征测量比较

	SHOX 异常（12 例）	无 SHOX 异常（36 例）	t 值	P 值
身高标准差	−2.80 ± 1.33	−2.4 ± 0.93	1.162	0.251
坐高/身高	56.08 ± 1.66	54.63 ± 1.60	2.707	0.009
臂展/身高	96.12 ± 1.60	97.61 ± 1.71	−2.649	0.011
前臂长/身高	14.20 ± 0.59	14.71 ± 0.66	−2.355	0.023
小腿长/身高	18.24 ± 0.85	19.72 ± 1.55	−3.125	0.003

未能包括全部的内含子及其上下游区域，故实际的 SHOX 异常率应高于此值。

SHOX 基因主要在四肢长骨表达，其单倍体剂量不足可致肢体短小为主的矮小，即显著特征是非匀称型短肢性矮小。本研究发现 SHOX 异常者坐高/身高增加，臂展/身高明显减小，提示躯干的比例相对增大，肢体短小为主；前臂长/身高、小腿长/身高明显减小，提示四肢短小以前臂和小腿短小明显，此与 SHOX 基因主要在肢远端表达有关。SHOX 异常组的身高标准差 −2.8 ± 1.33s，与无 SHOX 异常组的身高标准差 −2.4 ± 0.93s 均无统计学差异。

观察 12 例基因异常患者左前臂及左腕部 X 线正位片，发现 9 例（男 4 例，女 5 例）患者分别有腕骨角减小，第 4 掌骨短小，桡骨骨骺三角形，桡骨弯曲，尺桡骨远端相对侧骨骺发育差的骨骼改变，即有轻微的马德隆畸形骨骼特征，但其程度不足以诊断为马德隆畸形，这些患者的表型介于 ISS 和 LWD 之间。提示对 SHOX 异常的骨骼特征，需综合分析；寻找轻微的马德隆畸形骨骼特征有助于 SHOX 异常的诊断。利用腕尺距离比和垂高/弦长观察 SHOX 异常所引起的桡骨弯曲和腕骨尺侧移位的情况，尚未发现 SHOX 异常与无 SHOX 异常组矮小儿童之间的差异（$P>0.05$）。因本组资料样本量

少,不能就此定论,需进一步扩大样本量,同时应继续与正常儿童相应指标进一步比较。另外,本组 SHOX 异常患儿的平均年龄为(9.1 ± 3.02)岁,年龄偏小,3 例无明显骨骼改变的患儿年龄分别为 4.8 岁(男)、8.2 岁(男)和 7.6 岁(女),均为青春前期儿童,SHOX 异常时,抑制雌激素加速生长板成熟的作用减弱,青春期雌激素的分泌增加促进骨骼不均衡的提前融合,因此骨骼异常随年龄增加可能会逐渐明显[11],应继续随访其骨骼改变。

12 例基因异常者的身高标准差为 -2.8 ± 1.33s,范围为 -1.4s ~ -6s,多低于同年龄同性别儿童的 -2s。有 2 例未低于 -2s,即身高在正常范围,年龄分别为 4.8 岁(-1.8s),12.4 岁(-1.4s),表明 SHOX 异常的表型异质性较大,可以高于矮小的标准。目前表型异质性分子机制还知之甚少。以往研究已排除 SHOX 基因缺失的大小与不同表型的关联,亦除外 SHOX 基因的突变类型与其表型的多样性相关。表型高度异质中可能原因有:①未分析的区域可能存在变异,如 SHOX 上游区、下游区调节序列等;②性染色体特异性调节;③修饰基因的受累[12];④遗传不均一性。也有人推测复杂的异质性与 SHOX 蛋白在骨骼不同部位的表达程度不同相关。也可能与本研究样本量少有关。

有研究表明有些 SHOX 异常者青春期前身高可能正常,但青春期雌激素的分泌增加促进骨骼不均衡的提前融合,导致最终成人身材矮小。因此,对于身高在正常低限且有遗传因素的儿童应随访其身高和骨骼的动态变化情况。因例数少,本资料尚未发现 SHOX 异常者的身高分布与年龄的关系。应继续扩大样本量研究。

尽管没有生长激素缺乏,重组人生长激素治疗可以改善 SHOX 异常患者的最终身高[13,14]。SHOX 异常时,抑制雌激素加速生长板成熟的作用减弱。进入青春期后,用促性腺激素释放激素类似物协同生长激素治疗,可预防骨骼的提前融合,减轻骨骼异常[15],并改善最终身高,尤其是 SHOX 单倍体剂量不足的女性患儿。

本研究收集的重庆地区 203 例矮小患者中共有 12 例 SHOX 基因异常,SHOX 缺陷的频率为 5.9%,其表型异质性较大,表现为肢中部短小,即非匀称型短肢性矮小,尤以前臂和小腿短小明显。SHOX 异常患儿多有轻微的骨骼特征改变,需综合分析,从左前臂及左腕部 X 线正位片寻找轻微的马德隆畸形骨骼特征有助于 SHOX 异常的诊断。下一步工作是扩大样本量和对基因其他位点进一步研究,以及进一步与正常儿童的对照比较,可进一步了解 SHOX 基因异常者骨骼改变特征规律。

参 考 文 献

[1] Rao E, Weiss B, Fukami M, et al .Pseudoautosomal deletionts encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and turner syndrome[J].Nature Genet, 1997, 16(1): 54-63.

[2] Ellison J W, Wardak Z, Young M F, et al.PHOG, a candidate gene for involvement in the short stature of Turner syndrome[J].Humman molcular Genetics, 1997, 6(8): 1341-1347.

[3] Sabherwal N, Blaschke R J.A novel point mutation A170P in the SHOX gene defines impaired nuclear translocation as a molecular cause for Léri-Weill dyschondrosteosis and langer dysplasia[J].Journal of Medical genetics, 2004, 41:83.

[4] Shears D J, Vassal H J, Goodman F R, et al.Mutation and deletion of the pseudoautosomal gene SHOX cause Leri-Weill dyschondrosteosis[J]. Nature Genet, 1998, 19(1): 70-73.

[5] Rüdiger J B, Christine T.Transcriptional and translational regulation of the léri-weill and turner syndrome homeobox gene SHOX[J].The Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(48): 47820-47826.

[6] Rao E, Weiss B, Fukami M, et al.Pseudoautosomal deletions encompassing a novel homeobox gene cause growth failure in idiopathic short stature and turner syndrome[J].Nature Genetics, 1997, 16(1): 54-63.

[7] Rappold G A, Fukami M, Niesler B, et al.Deletions of the homeobox gene SHOX (short stature homeobox) are an important cause of growth failure in children with short stature[J].Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2002, 87(3): 1402-1406.

[8] Stuppia L, Calabrese G, Gatta V, et al. SHOX mutations detected by FISH and direct sequencing in patients with short stature[J].Journal of Medical Genetics, 2003, 40(2): 11.

[9] Huber C, Rossilio M, Munnich A, et al.High incidence of SHOX anomalies in patients with short stature[J]. Journal of Medical Genetics, 2006, 43(9): 735-739.

[10] Rouyer F, de la Chapelle A, Andersson M, et al.An interspersed repeat sequence specific for human subtelomeric regions[J].The EMBO Journal, 1990, 9(2): 505-514.

[11] Maki F, Nobutake M, Tomonobu H, et al. Longitudinal auxological study in a female with SHOX(short stature homeobox containing gene) haploinsufficiency and normal ovarian function[J].European Journal of Endocrinology, 2003, 149(4): 337-341.

[12] Mutesa L, Vanbellinghen J F, Hellin A C, et al.Deletion of Xpter encompassing the SHOX gene and PAR1 region in familial patients with Leri-Weill dyschondrosteosis syndrome[J].Genet Couns, 2009, 20(1): 9-17.

[13] Werner F. Blum a, Dachuang Cao b, et al.Height gains in response to growth hormone treatment to final height are similar in patients with SHOX deficiency and turner syndrom[J].Hormone metabolismr Research, 2009, 71(3): 167-172.

[14] Tatsuhiko U, Maki H, Shigeo M, et al.2009 Effect of growth hormone therapy in two sisters with SHOX haploinsufficiency[J].Pediatrics International, 2009, 51(4): 574-599.

[15] Ogata T, Onigata K, Hotsubo T, et al.Growth hormone and gonad tropin-releasing hormone analog therapy in haploinsufficiency of SHOX[J]. Endocrine Journal, 2001, 48(3): 317-322.

(责任编辑:张学颖)