

罕见病研究

SRD5A2 基因新型复合杂合突变致类固醇 5- α 还原酶 2 型缺乏症的遗传变异分析

初国铭¹ 李萍萍² 常文婧¹ 何蓉¹ 赵彦艳¹

(1. 中国医科大学附属盛京医院临床遗传科, 辽宁 沈阳 110004;
2. 中国医科大学附属盛京医院生殖医学中心, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] 该文报道 1 例类固醇 5- α 还原酶 2 型缺乏症患儿的临床特征及 *SRD5A2* 基因突变特点。患儿男性, 2 月龄, 生后即出现尿道下裂及阴茎短小。提取患儿及父母外周血 DNA, 通过高通量测序技术对患儿 DNA 样本进行内分泌疾病相关基因的捕获测序, 并对家系 DNA 样本进行 Sanger 测序验证。结果显示患儿 *SRD5A2* 基因存在 c.680G>A(p.R227Q) 和 c.608G>A(p.G203D) 复合杂合突变, 其中 c.680G>A 来源于其父亲, 为已知致病性突变, c.608G>A 来源于其母亲, 为新发现的突变。该研究为患儿病因诊断及该家系的遗传咨询提供了分子依据, 并扩展了 *SRD5A2* 基因突变谱。
[中国当代儿科杂志, 2020, 22(7): 790-795]

[关键词] 类固醇 5- α 还原酶 2 型缺乏症; 尿道下裂; *SRD5A2* 基因; 二代测序; 儿童

Variant analysis on steroid 5-reductase type 2 deficiency caused by a novel *SRD5A2* mutation

CHU Guo-Ming, LI Ping-Ping, CHANG Wen-Jing, HE Rong, ZHAO Yan-Yan. Department of Clinical Genetics, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China (Zhao Y-Y, Email: yyzhao@sj-hospital.org)

Abstract: This article reported the clinical characteristics and *SRD5A2* gene mutation pattern of a child with steroid 5- α reductase type 2 deficiency. The 2-month-old boy showed hypospadias and short penis shortly after birth. DNA was extracted from the peripheral blood of the child and his parents. The endocrine disease-related genes were captured and sequenced by high-throughput sequencing technology, and the family DNA samples were verified by Sanger sequencing. The results showed that c.680G>A(p.R227Q) and c.608G>A(p.G203D) compound heterozygous mutations existed in the *SRD5A2* gene of the child. The c.680G>A mutation inherited from his father, which was a known pathogenic mutation. The c.608G>A mutation originated from his mother, which was a novel mutation discovered in this study. These results provide molecular evidence for the etiological diagnosis of the child and genetic counseling for the family, as well as extend the mutation spectrum of *SRD5A2* gene.
[Chin J Contemp Pediatr, 2020, 22(7): 790-795]

Key words: Steroid 5-reductase type 2 deficiency; Hypospadias; *SRD5A2* gene; Next generation sequencing; Child

性发育异常 (disorders of sexual development, DSD) 是由于染色体、性腺及解剖学水平上性别不典型的一类先天性性腺发育异常的疾病总称。根据染色体核型可将 DSD 分为 46,XX DSD (发病率为 1/25 000~1/20 000)^[1] 和 46,XY DSD (发病率为 1.5/100 000)^[2] 两种类型。46,XX DSD 可由 46,XX 患者表达性别决定基因 *SRY* 或者雄性激素高表达

引起。目前已知的 46,XY DSD 致病基因除了与性别决定相关的 *SRY*、*SOX9* 及 *SFI* 等外, 还有雄激素合成相关的 *CYP11A1*、*CYP17A1* 及 *SRD5A2* 等基因^[3-5]。尿道下裂或者阴茎短小是非典型 46,XY DSD 患者中最常见的临床表现, 大约 300~400 个非典型 46,XY DSD 新生儿中就会出现 1 例尿道下裂患儿^[6]。

[收稿日期] 2019-12-09; [接受日期] 2020-05-27

[基金项目] 国家重点研发计划 (2016YFC1000702)。

[作者简介] 初国铭, 男, 博士, 主管技师。

[通信作者] 赵彦艳, 女, 教授。Email: yyzhao@sj-hospital.org。

类固醇 5- α 还原酶 2 型缺乏症, 又称假阴道会阴尿道下裂 (pseudovaginal perineoscrotal hypospadias, OMIM: 264600), 是影响男性性发育的一种常染色体隐性遗传疾病, 通常在出生前或青春期发病, 多数患者呈女性外生殖器外观, 少数患者外生殖器模糊, 难以分辨性别。另有患者外生殖器为男性, 但会伴有小阴茎和尿道下裂等, 具体发病率不详。5- α 还原酶 2 型缺乏症是由 *SRD5A2* 基因 (OMIM: 607306) 突变所致, 人类 *SRD5A2* 基因位于 2 号染色体 2p23.1 位置, 全长约为 143 172 bp, 含有 5 个外显子和 4 个内含子, 通用转录本为 NM_000348, 编码蛋白质包含 254 个氨基酸 (NP_000339), 在胚胎时期高表达于睾丸和前列腺组织, *SRD5A2* 基因编码生成 5- α 还原酶 2, 其生物学功能是特异性催化睾酮转化为双氢睾酮 (dihydrotestosterone, DHT)^[7]。1974 年 Walsh 等^[8] 首次报道两个 5- α 还原酶 2 型缺乏症兄弟, 该患者表现为 46,XY DSD, 外观表现为女性, 而直到 1991 年才有确诊的首例 *SRD5A2* 基因缺失突变致男性假两性畸形的报道^[9]。截至目前, 人类基因突变数据库 (Human Gene Mutation Database, HGMD) 收录的 *SRD5A2* 基因突变已超过 100 个^[10]。

本研究通过一系列实验室血清学辅助检查、染色体核型及微缺失微重复检测, 最终利用以高通量测序平台为基础的单基因捕获技术对 1 例尿道下裂及阴茎短小患儿进行了精确诊断, 确定其为 *SRD5A2* 基因复合杂合突变, 进一步分析突变的致病性, 最终明确了其分子遗传学病因, 为该患儿的临床治疗提供了遗传学依据, 且为今后的相关类似病例提供了一套明确的诊断流程。

1 资料与方法

1.1 病例介绍

患儿男性, 2 月龄, 生后发现阴茎短小, 为求病因学诊断前来中国医科大学附属盛京医院儿科就诊。患儿父母身体健康, 患儿为第 1 胎第 1 产, 足月剖宫产, 出生体重 3.9 kg, 出生身长 48 cm, 母孕期无异常, 无围产期并发症, 否认家族遗传病史。

体格检查: 精神可, 反应良好, 发育良好, 体重 5 kg, 身长 55 cm; 双肺呼吸音清, 未闻及啰

音; 心音有力, 律齐, 心率 86 次/min, 各瓣膜区未闻及病理性杂音; 腹软, 无压痛及反跳痛, 肝脾未触及; 四肢肌张力正常; 尿道下裂, 阴茎短小, 长约 0.8 cm, 海绵体发育细, 双侧睾丸位于阴囊内。

患儿初步诊断为 DSD, 需进一步进行染色体及基因水平的诊断。4 月龄时复诊, 染色体核型结果显示患儿核型为 46,XY, 未见异常, 排除染色体疾病导致的 DSD; 体查发现外阴粘连, 阴茎显露不清, 尿道外口不可见, 双阴囊及腹股沟内无睾丸, 外阴似大阴唇, 可触及睾丸。DSD 的症状较 2 月龄时更为显著, 外生殖器外观更为模糊。

辅助检查: 彩超提示双侧睾丸鞘膜积液; 激素检查结果提示促肾上腺皮质激素 (adreno-corticotrophic-hormone, ACTH)、皮质醇及性激素检测 (雌二醇、促卵泡生成素、促黄体生成素、孕酮及睾酮) 等辅助检查均在正常范围内。所有样本的使用均获父母知情同意, 并通过中国医科大学附属盛京医院伦理委员会审查。

1.2 DNA 提取

在无菌条件下, 采集患儿及父母外周血 2 mL 至 EDTA 抗凝采血管中, 使用 QIA amp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) 试剂盒, 参照产品说明提取基因组 DNA, 使用 Qubit 2.0 荧光计 (Invitrogen) 测量 DNA 浓度后, -20℃ 保存待用。

1.3 全基因组低深度测序检测

取患儿 DNA, 使用科诺安染色体拷贝数变异检测试剂盒 (货号 KR2000) 构建文库, 利用 Nextseq CN500 高通量测序平台, 进行全基因组低深度测序 (CNV-seq, 测序深度 0.06~0.1 \times), 数据总 reads 数为 5 M, 通过科诺安数据分析系统 V3.0 (贝瑞基因) 进行数据分析, 本实验最终可见大小为 100 kb 的变异。

1.4 高通量测序检测

取患儿 DNA, 通过探针捕获内分泌疾病 (包括 DSD 相关疾病) 相关 359 个基因的外显子及相邻内含子区域 (± 50 bp), 构建文库, 利用 Nextseq CN500 高通量测序平台进行测序, 平均测序深度 200 \pm 20 \times , 覆盖度 10 \times 数据 >95%。对测序原始数据进行预处理, 去除低质量 reads 及短序列 (<40 bp), 应用 BWA、Samtools、Picard、GATK、Annovar 等软件对预处理的数据进行分析, 确定候选基因突变位点。

1.5 Sanger 测序

针对高通量测序筛选出的可疑基因突变位点设计扩增引物，使用 PCR 高保真酶（PrimeSTAR[®] HS DNA Polymerase, Takara）扩增出目的基因片段（扩增引物见表 1），使用 BigDye[™] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Applied Biosystems）进行测序扩增（测序引物同上），通过一代测序仪 3730 DNA Analyzer（Applied Biosystems）针对目的片段进行测序，对患儿及父母进行家系验证。

表 1 *SRD5A2* 基因突变位点引物序列

引物名称	引物序列 (5' → 3')	产物长度
<i>SRD5A2</i> - 上游引物	TCTTCCTCTGCGGGTTAAAA	392 bp
<i>SRD5A2</i> - 下游引物	CCTTCTCCCAAGAGGATTC	

1.6 突变位点的致病性分析

对检测到的变异进行致病性分析，使用表 2 中所列出的数据库及软件进行检索分析，判断变异的致病性。

表 2 检索用数据库及软件

类型	数据库	网址
疾病数据库	HGMD 人类基因变异数据库	http://www.hgmd.org
	Clinvar 数据库	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar
	OMIM 数据库	http://www.omim.org
人群数据库	千人基因组计划	http://browser.1000genomes.org
	ESP 数据库	http://evs.gs.washington.edu/EVS
	ExAC 数据库	http://exac.broadinstitute.org
预测软件	SIFT	http://sift.jcvi.org
	PROVEAN	http://provean.jcvi.org/index.php
	PolyPhen-2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2
	Align GVGD	http://agvgd.iarc.fr

2 结果

2.1 CNV-seq 检测结果

染色体微缺失微重复是 DSD 的一个致病因素。

本研究通过 CNV-seq 方法进行鉴定，结果为 46,XY，未发现患儿存在 100 kb 以上的染色体拷贝数变异，见图 1。

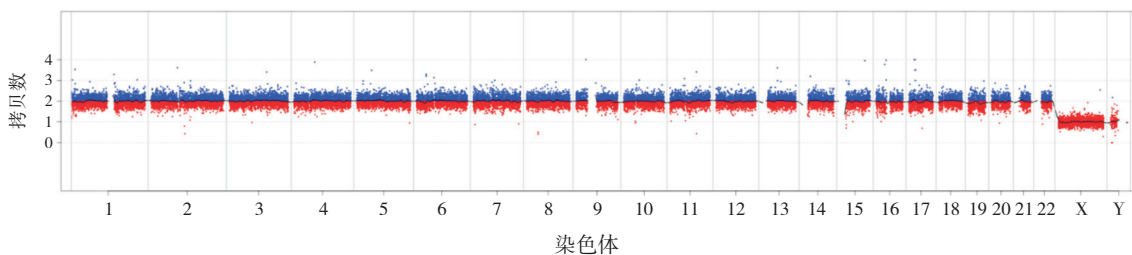


图 1 患儿 CNV-seq 检测结果 结果显示为 46,XY，未发现染色体非整倍体及 100 kb 以上的基因组拷贝数变异。

2.2 目标捕获测序与 Sanger 测序验证结果

由于患儿在染色体水平未见致病性变异，因此，为了验证患儿是否患有单基因病，我们通过高通量测序结合基因捕获技术对 359 个包括 DSD 相关基因在内的内分泌疾病相关基因进行捕获并测序，结果提示患儿 *SRD5A2* 基因（NM_000348）疑似存在 c.680G>A(p.R227Q) 和 c.608G>A(p.G203D)

两个杂合变异。

为了证实患儿 *SRD5A2* 基因上 c.680G>A(p.R227Q) 和 c.608G>A(p.G203D) 两个变异的来源，我们通过 Sanger 测序进行了家系验证，结果如图 2 所示，患儿 *SRD5A2* 基因变异 c.680G>A(p.R227Q) 来源于其父亲，变异 c.608G>A(p.G203D) 来源于其母亲，组成了复合杂合变异。

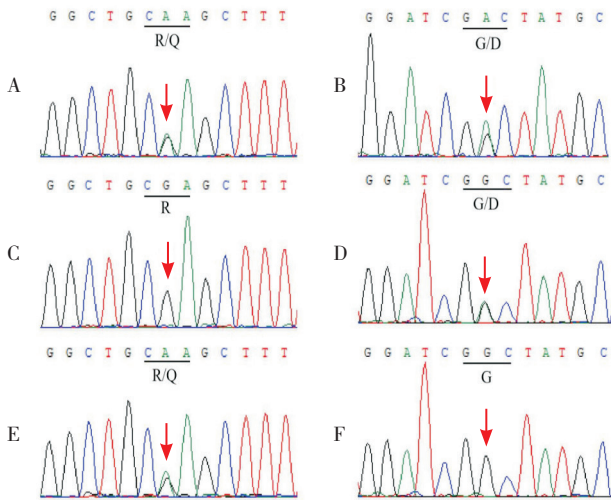


图2 患儿及其父母 SRD5A2 基因突变位点 Sanger 测序结果 A 和 B 分别为患儿 SRD5A2 基因第 680 和 608 位核苷酸基因型；C 和 D 分别为母亲 SRD5A2 基因第 680 和 608 位核苷酸基因型；E 和 F 分别为父亲 SRD5A2 基因第 680 和 608 位核苷酸基因型。箭头所示为突变位点。

2.3 变异位点致病性分析

Hiort 等^[11]的研究已证实突变 c.680G>A(p.R227Q) 与类固醇 5- α 还原酶 2 型缺乏症相关, 为致病性变异。SRD5A2 基因 c.608G>A(p.G203D) 突变即编码区第 608 位核苷酸由鸟嘌呤变异为腺嘌呤, 导致蛋白质第 203 位氨基酸由甘氨酸变异为天冬氨酸, 为错义突变。为了明确该变异的致病性, 首先检索 HGMD、OMIM 及 Clinvar 等疾病数据库, 未见该变异的报道, 此变异为本研究首次发现; 其次通过查询千人基因组计划、ESP 数据库及 ExAC 数据库得知, 该变异人群频率未知; 最后使用蛋白功能预测软件进行致病性预测, SRD5A2 蛋白质第 203 位甘氨酸在不同物种中高度保守(图 3), SIFT、PROVEAN、PolyPhen-2 和 Align GVGD 等软件均预测 SRD5A2 基因 c.608G>A(p.G203D) 为有害变异(表 3)。因此, 我们判断该患儿 SRD5A2 基因存在的 c.680G>A(p.R227Q) 和 c.608G>A(p.G203D) 复合杂合突变为其致病的遗传学原因。

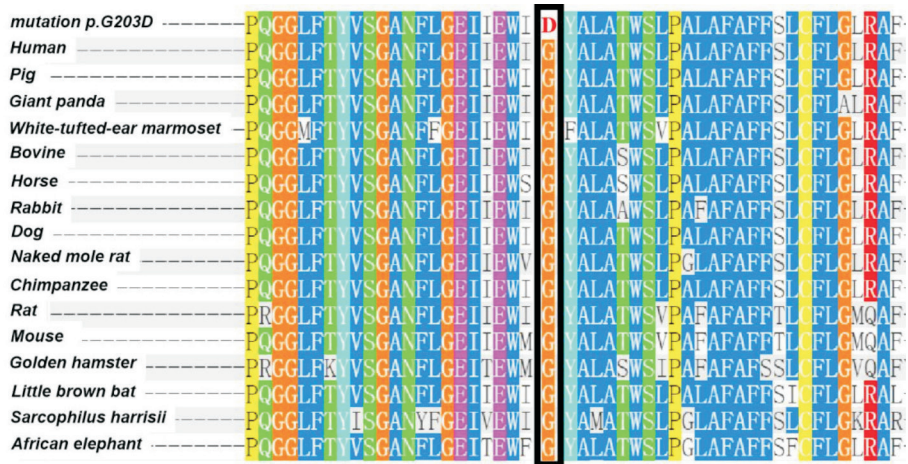


图3 不同物种间 SRD5A2 蛋白质序列比对 黑框标出 SRD5A2 蛋白质第 203 位甘氨酸 (G) 所在位置, 首行为突变后变异为天冬氨酸 (D)。

表3 预测软件对 SRD5A2 基因 c.608G>A (p.G203D) 变异的分析结果

预测软件	得分 / 等级	是否有害	“有害”的定义
SIFT	0.04	是	得分 < 0.05
PROVEAN	-6.666	是	≤ 阈值 (-2.5)
PolyPhen-2	1.000	是	得分 0.447~0.909 为可能有害; 得分 0.910~1.000 为极有可能有害
Align GVGD	C65	是	从 C0~C65, 预测致病性等级由低到高

2.4 治疗与结局

患儿的临床表型包括外生殖器外观模糊, 外阴粘连, 阴茎显露不清, 尿道外口不可见, 双阴囊及腹股沟内无睾丸, 外阴似大阴唇, 可触及睾丸, 提示其可能为 DSD 患者; 此外, 通过基因突变检测发现 SRD5A2 基因存在 c.680G>A(p.R227Q) 和 c.608G>A(p.G203D) 的复合杂合突变, 均为致病性变异, 患儿确诊为 5- α 还原酶 2 型缺乏症。根据 5- α 还原酶 2 型缺乏症的治疗原则, 患儿 5 月

龄开始给予 DHT 凝胶药物干预,每晚睡前用 2.5% DHT 凝胶涂抹于阴茎及其根部,剂量为 10 mg/d,2 个月后复查血睾酮、DHT 含量均在正常范围,继续按照上述用量给药。6 个月后复查,阴茎长度达 2 cm。给予患儿家属手术建议:当患儿阴茎长度到达 3 cm 以上可进行手术,建议尽早行睾丸固定手术,尿道下裂手术建议在 2 岁前进行。

3 讨论

典型的 46,XY DSD 患者可分化出女性内、外生殖器,而临床上最为常见的症状仅为轻微的尿道下裂和小阴茎,因此在临床工作中需要将 5- α 还原酶 2 型缺乏症与其他疾病进行鉴别。*SRY* 基因突变是最为常见的 46,XY DSD 遗传学致病因素,该病患者多出现原发性闭经,超声检查可见子宫发育不良,激素检查可见雌激素降低、促黄体生成素和促卵泡生成素升高,这些表现均可用来与 5- α 还原酶 2 型缺乏症进行鉴别。雄激素不敏感综合征是由于雄激素受体缺陷引起的男性生殖器发育异常,患者核型为 46,XY,其中完全型雄激素不敏感综合征患者外生殖器呈女性外观,无子宫,促黄体生成素和睾酮水平显著升高,可以通过激素水平的变化进行鉴别,而不完全型雄激素不敏感综合征患者临床表型异质性大,需要通过基因检测进行鉴别。除此之外,激素合成相关基因如 *CYP11A1*、*CYP17A1* 等突变均可导致 46,XY DSD,而基因突变检测是鉴别诊断最精确的检测手段。

46,XY DSD 临床异质性大,遗传因素众多,随着高通量测序技术的发展,可以通过多个基因的同时捕获测序代替传统的单个基因扩增测序来检测基因突变,使得不同基因致 46,XY DSD 疾病之间的鉴别诊断更加简便快捷。本研究通过高通量测序结合基因捕获技术进行基因检测,涵盖了已知的 DSD 相关疾病致病基因,随后通过 Sanger 测序进行家系验证,结果显示患儿 *SRD5A2* 基因(NM_000348)存在 c.680G>A(p.R227Q)和 c.608G>A(p.G203D)的两个复合杂合突变,其中 c.680G>A 来源于其父亲,c.608G>A 来源于其母亲。在所有已报道的致病突变中大约 60% 为错义突变,剪切突变、无义突变及移码突变等零效变异大约占 18%^[12],基因突变可导致酶活性部分或完全损害,

例如突变 c.635C>G(p.P212R) 可导致酶活性完全缺乏^[13],然而目前未见该病临床表型与基因型之间存在关联的证据^[14],所以无法通过基因型判断临床表型。根据已报道的突变可发现大部分致病性突变均位于 *SRD5A2* 基因外显子 1 和 4 上,不同人种的常见突变存在差别。本研究中检出的突变 c.680G>A(p.R227Q) 在中国人群最为常见^[15],此外,c.607G>A(p.G203S)、p.R246Q 等变异在中国人群频率相对较高,突变 c.635C>G(p.P212R) 和 p.G34R 在墨西哥和埃及人群中较常见^[16],而在巴西和葡萄牙人群中突变 p.Q126R 多见^[17],有报道称在多米尼加共和国、新几内亚及土耳其等国家发现的 5- α 还原酶 2 型缺乏症患者多是由于 *SRD5A2* 基因纯合突变所致,然而在中国多由复合杂合突变所致^[18]。*SRD5A2* 基因 c.608G>A(p.G203D) 突变为本研究首次发现,该突变导致 *SRD5A2* 基因编码区第 608 位核苷酸由鸟嘌呤变异为腺嘌呤,蛋白质第 203 位氨基酸由甘氨酸变异为天冬氨酸,为错义突变,通过查询人类疾病数据库及文献未见相关报道,查询正常人群数据库该突变频率未知,通过 SIFT、PROVEAN、PolyPhen-2 和 Align GVGD 等软件对蛋白功能进行预测,结果均显示为有害。目前在临床工作中,美国医学遗传学与基因组学学会(American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG) 指南是判定遗传变异致病性的主要依据,而根据 ACMG 指南,在本研究对象中 *SRD5A2* 基因 c.608G>A(p.G203D) 变异涵盖如下证据:PM2(该变异在正常人群数据库中的频率未知,为低频变异),PM3(隐性遗传病中,该变异与另一致病性突变组成复合杂合突变),PP3(经蛋白功能预测软件 SIFT、PROVEAN、PolyPhen-2 和 Align GVGD 预测均显示为有害变异),PP4(患儿的临床表现与该变异相关的疾病高度吻合),因此在临床上我们判断 c.608G>A(p.G203D) 变异为疑似致病变异。此外,中国人群常见的 *SRD5A2* 基因突变 c.607G>A(p.G203S) 患者通常可表现为阴茎阴囊型尿道下裂,伴有不同程度的阴茎阴囊转位,有研究表明该变异仅保留酶的活性 40%^[19],该位点与本研究对象中的突变 c.608G>A(p.G203D) 均使第 203 位甘氨酸发生改变,不同的是本研究所发现突变导致第 203 位甘氨酸变异为天冬氨酸而不是丝氨酸,提示变异 c.608G>A(p.G203D) 也可

能会导致酶活性降低,而进一步构建 *SRD5A2* 基因 c.608G>A(p.G203D) 突变的细胞系,鉴定突变 5- α 还原酶蛋白质的表达及活性,将有助于进一步证实新发突变 c.608G>A(p.G203D) 对 *SRD5A2* 基因表达及蛋白质功能的影响。

对于 5- α 还原酶 2 型缺乏症的治疗,首先考虑到患者的社会性别选择,根据患者的生殖器生理及解剖特点,患者的心理、社会和环境因素给予适当治疗措施,主要包括激素(DHT)替代治疗及手术治疗等。手术主要包括阴茎再造术、尿道成形术及睾丸固定术等。本研究中患儿初期给予 DHT 药物干预后,阴茎长度有增加,但还未达到手术标准,建议患儿 2 周岁前行睾丸固定术及尿道成形术。对于男性社会性别选择的患者成年后可通过辅助生殖手段进行生育,女性社会性别选择患者无生育能力。研究表明,青春期后睾丸发育不良的患者发生癌变的风险较高,且随着年龄增大风险逐步增高^[20],因此对于此类患者,建议尽早行性腺切除术以避免发生恶变。

本研究通过目标基因捕获结合高通量测序技术明确了 1 例尿道下裂及小阴茎患儿的遗传学病因,其中 c.608G>A(p.G203D) 为本研究首次发现,丰富了 *SRD5A2* 基因的突变谱,同时也为临床上大量尿道下裂及小阴茎患者的精确诊断提供了一个快速有效的检测手段。

[参 考 文 献]

[1] Wang T, Liu JH, Yang J, et al. 46,XX male sex reversal syndrome: a case report and review of the genetic basis[J]. *Andrologia*, 2009, 41(1): 59-62.

[2] Berglund A, Johannsen TH, Stochholm K, et al. Incidence, prevalence, diagnostic delay, and clinical presentation of female 46,XY disorders of sex development[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2016, 101(12): 4532-4540.

[3] Tajima T, Fujieda K, Kouda N, et al. Heterozygous mutation in the cholesterol side chain cleavage enzyme (p450scc) gene in a patient with 46,XY sex reversal and adrenal insufficiency[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(8): 3820-3825.

[4] Miller WL. Mechanisms in endocrinology: rare defects in adrenal steroidogenesis[J]. *Eur J Endocrinol*, 2018, 179(3): R125-R141.

[5] Ye L, Su ZJ, Ge RS. Inhibitors of testosterone biosynthetic and metabolic activation enzymes[J]. *Molecules*, 2011, 16(12): 9983-10001.

[6] Lund L, Engebjerg MC, Pedersen L, et al. Prevalence of hypospadias in Danish boys: a longitudinal study, 1977-2005[J].

Eur Urol, 2009, 55(5): 1022-1026.

[7] Thareja S. Steroidal 5 α -reductase inhibitors: a comparative 3D-QSAR study review[J]. *Chem Rev*, 2015, 115(8): 2883-2894.

[8] Walsh PC, Madden JD, Harrod MJ, et al. Familial incomplete male pseudohermaphroditism, type 2. Decreased dihydrotestosterone formation in pseudovaginal perineoscrotal hypospadias[J]. *N Engl J Med*, 1974, 291(18): 944-949.

[9] Andersson S, Berman DM, Jenkins EP, et al. Deletion of steroid 5 alpha-reductase 2 gene in male pseudohermaphroditism[J]. *Nature*, 1991, 354(6349): 159-161.

[10] Nagaraja MR, Gubbala SP, Delphine Silvia CRW, et al. Molecular diagnostics of disorders of sexual development: an Indian survey and systems biology perspective[J]. *Syst Biol Reprod Med*, 2019, 65(2): 105-120.

[11] Hiort O, Sinnecker GH, Willenbring H, et al. Nonisotopic single Strand conformation analysis of the 5 alpha-reductase type 2 gene for the diagnosis of 5 alpha-reductase deficiency[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81(9): 3415-3418.

[12] Gui B, Song Y, Su Z, et al. New insights into 5 α -reductase type 2 deficiency based on a multi-centre study: regional distribution and genotype-phenotype profiling of SRD5A2 in 190 Chinese patients[J]. *J Med Genet*, 2019, 56(10): 685-692.

[13] Vilchis F, Ramos L, Méndez JP, et al. Molecular analysis of the SRD5A2 in 46,XY subjects with incomplete virilization: the P212R substitution of the steroid 5alpha-reductase 2 may constitute an ancestral founder mutation in Mexican patients[J]. *J Androl*, 2010, 31(4): 358-364.

[14] Avendaño A, Paradisi I, Cammarata-Scalisi F, et al. 5- α -Reductase type 2 deficiency: is there a genotype-phenotype correlation? A review[J]. *Hormones (Athens)*, 2018, 17(2): 197-204.

[15] Cheng J, Lin R, Zhang W, et al. Phenotype and molecular characteristics in 45 Chinese children with 5 α -reductase type 2 deficiency from South China[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2015, 83(4): 518-526.

[16] Mazen I, Gad YZ, Hafez M, et al. Molecular analysis of 5alpha-reductase type 2 gene in eight unrelated Egyptian children with suspected 5alpha-reductase deficiency: prevalence of the G34R mutation[J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2003, 58(5): 627-631.

[17] Leme de Calais FL, Soardi FC, Petroli RJ, et al. Molecular diagnosis of 5 α -reductase type II deficiency in Brazilian siblings with 46,XY disorder of sex development[J]. *Int J Mol Sci*, 2011, 12(12): 9471-9480.

[18] Cai LQ, Zhu YS, Katz MD, et al. 5 alpha-reductase-2 gene mutations in the Dominican Republic[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1996, 81(5): 1730-1735.

[19] Yang Y, Wang BA, Guo QH, et al. Clinical and genetic analysis of three Chinese patients with steroid 5 α -reductase type 2 deficiency[J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2012, 25(11-12): 1077-1082.

[20] Kilcoyne KR, Mitchell RT. Effect of environmental and pharmaceutical exposures on fetal testis development and function: a systematic review of human experimental data[J]. *Hum Reprod Update*, 2019, 25(4): 397-421.

(本文编辑: 邓芳明)