

MKRN3 基因与儿童中枢性性早熟

石玉兰^{1,2}, 贵子豪¹, 郭冰冰¹, 徐高生^{1*}, 莫中成^{1,2*}

(1. 南华大学衡阳医学院应用解剖与生殖医学研究所, 南华大学 岳阳市妇幼保健院基础与临床协同研究生培养创新实践基地, 组织学与胚胎学教研室, 湖南 衡阳 421001;
2. 邵阳学院附属第二医院儿科, 湖南 邵阳 422000)

摘要: 中枢性性早熟是一种常见的儿童性发育异常性疾病, 其发病机制暂不明确。环指蛋白 3 基因的功能丧失性突变是中枢性性早熟的重要致病因素。在目前已证实的中枢性性早熟相关致病基因中, 环指蛋白 3 基因所致性早熟的发病率相对较高。本文综述了环指蛋白 3 基因的结构, 突变, 以及对于青春期时间可能的影响。

关键词: 环指蛋白 3 基因; LIN28B 基因; 促性腺激素释放激素; Nptx1 神经元

中图分类号: R725.8

文献标识码: A

MKRN3 gene and central precocious puberty

SHI Yulan^{1,2}, GUI Zihao¹, GUO Bingbing¹, XU Gaosheng^{1*}, MO Zhongcheng^{1,2*}

(1. *Clinical Anatomy & Reproductive Medicine Application Institute, Hunan Province Innovative Training Base for Medical Postgraduates, University of South China and Yueyang Women & Children's Medical Center, Department of Histology and Embryology, University of South China, Hengyang 421001, Hunan, China*; 2. *the Department of Pediatrics in The Second Affiliated Hospital of Shaoyang University, Shaoyang 422000, Hunan, China*)

Abstract: Central precocious puberty (CPP) is a common childhood sexual dysplasia, but its pathogenesis is not clear. The loss-of-function mutation of makorin ring finger protein-3 (MKRN3) gene is an important factor, which is associated with central precocious puberty. MKRN3 owns higher incidence of precocious puberty in all related genes which have been identified. This article reviews the structure, mutations of MKRN3 gene and the possible effects in puberty.

Key words: MKRN3; LIN28B; GnRH; Nptx1; signal pathway

中枢性性早熟 (central precocious puberty, CPP) 是指女性在 8 岁前, 男性在 9 岁前内、外生殖器官提前快速发育, 并出现第二性征的一种常见儿科内分泌疾病。CPP 发生的机制可能与下丘脑-垂体-性腺轴 (hypothalamic-pituitary-gonadal axis, HPGA) 提前被激活有关。近年来, 环指蛋白 3 (makorin ring finger protein 3, MKRN3) 基因已被确定为 CPP 的易感基因, MKRN3 基因缺失突变导致 HPG 轴过早激活。Bo Ram Yi 研究了 103 名女孩和 70 名男孩 MKRN3 的多态性, 确定其与男孩的性早熟有关, 但

与女孩无关^[1]。Erina Suzuk 等人对 24 名患者 (22 名日本患者和 2 名中国患者) 的核苷酸取代进行分析, 发现在 19 名日本患者中发现了 DNA 甲基化缺陷和拷贝数改变, 但仅有一名女性发生 MKRN3 核苷酸取代^[2]。同时, 研究报告表明, MKRN3 缺陷在亚洲人群中很少见, 故推测这种罕见突变可能存在种族差异。本文将综述 MKRN3 基因与中枢性性早熟之间关系。

1 MKRN3 基因结构和功能

MKRN3 基因位于 Prader-Willi 综合征关键区域的染色体 15q11.2 上, 仅有外显子, 不含内含子, 是一种母系印记基因。MKRN 基因家族用特定的锌指基序阵列编码核糖核蛋白^[3-4]。MKRN3 蛋白具有 2

收稿日期: 2019-07-06; 修回日期: 2019-09-02

基金项目: 湖南省研究生科研创新项目 (CX2018B623); 应用解剖与生殖医学衡阳市重点实验室建设项目 (2017KJ182); 医教协同横向项目 (2018KH41)。

* 通信作者, E-mail: zhchmo@hotmail.com; 264661020@qq.com.

个 N 末端 C3H 锌指模体,1 个 MKRN 特异性 Cys-His 结构域,1 个 C3H4 RING 锌指模体和 1 个 C 末端 C3H 锌指模体^[5](图 1)。该蛋白参与细胞信号

转导过程及蛋白质的泛素化过程,但目前关于它的具体功能以及突变是如何导致中枢性性早熟的研究还不明确。

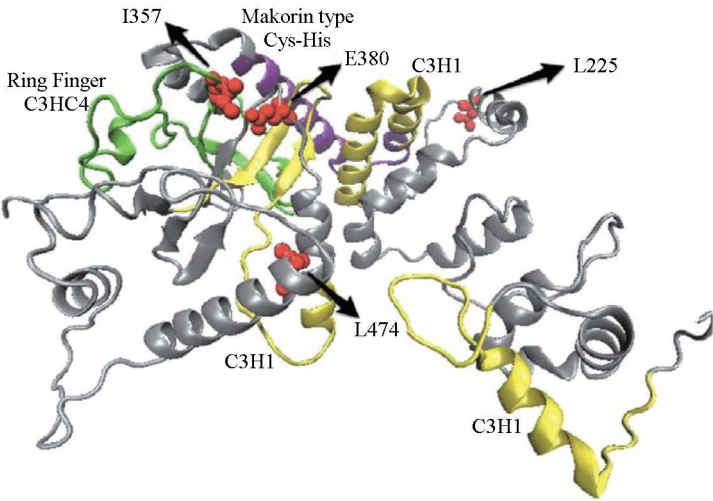


图 1 MKRN3 蛋白三维结构模式图^[5]

2 MKRN3 基因的突变

在 MKRN3 基因的研究中共发现了 33 个突变,其中 14 个是移码突变,17 个错义突变和 2 个无义突变^[6-7]。最近,刘璐等人在 2 个散发病例和 5 个家系病例中发现 4 种新的基因突变,分别为:c. 1138G>A (p. Glu380Lys)、c. 1420T>A (p. Leu474Met)、c. 673C>G (p. Leu225Val)、c. 1071C>G (p. Ile357Met)^[5](详见表二) Macedo D 对健康和中枢性早熟女孩进行甲基质谱分析,也发现在 CPP 患者启动子区域的 4 个罕见突变 4-nt deletion (c. -150_-147delTCAG;-38 to -41nt),这些突变会使 MKRN3 启动子活性显著降低,并认为其是导致 CPP^[8]的重要原因。

表 1 已证实的 MKRN3 基因突变

突变位点	氨基酸改变	突变类型
c. 683-684insA	p. Glu229Arg	移码突变
c. 482insC	p. Ala162Gly	移码突变
c. 802-803delAT	p. Met268Val	移码突变
c. 482delC	p. Pro161Arg	移码突变
c. 1053-1056delACAG	p. Arg351Ser	移码突变
c. 477-485del	p. Prol60Cys	移码突变
c. 475-476insC	p. Ala162Gly	移码突变
c. 482-483insC	p. Prol61Arg	移码突变
c. 675-676insA	p. Gln226Thr	移码突变

续表

突变位点	氨基酸改变	突变类型
c. 766-767delA	p. Glu256Gly	移码突变
c. 637delC	p. Arg213Gly	移码突变
c. 1171-1172insA	p. Tyr391 *	移码突变
c. 441-441deJG	p. His148Thr	移码突变
c. 331G>T	p. Glu11 *	移码突变
c. 1095G>T	p. Arg365Ser	错义突变
c. 1018T>G	p. Cys340Gly	错义突变
c. 1249T>A	p. Phe417Ile	错义突变
c. 1260T>G	p. His420Gln	错义突变
c. 1188C>A	p. Ser396Arg	错义突变
c. 699G>C	p. Lys233Asn	错义突变
c. 677A>C	p. Gln226Pro	错义突变
c. 611T>C	p. Ile204Thr	错义突变
c. 298A>T	p. Ile100Phe	错义突变
c. 587G>T	p. Gly196Val	错义突变
c. 1034G>A	p. Arg345His	错义突变
c. 737A>G	p. Tyr246Cys	错义突变
c. 1118C>T	p. Pro373Leu	错义突变
c. 89C>T	p. Pro30Leu	错义突变
c. 982C>T	p. Arg328Cys	错义突变
c. 943A>G	p. Met315Val	错义突变
c. 935G>A	p. Gly312Asp	错义突变
c. 1071C>G	p. Ile357Met	错义突变
c. 1138G>A	p. Glu380Lys	错义突变
c. 1420T>A	p. Leu474Met	错义突变
c. 673C>G	p. Leu225Val	错义突变
E298 *	p. Glu298Ter	无义突变
c. 841C>T	p. Gln281 *	无义突变

3 MKRN3 基因突变与性别的关系

有研究发现,女孩的 CPP 发病率高于男孩^[9-11],但最近 Lee HS 等人报道韩国女孩中枢性性早熟的 MKRN3 突变率较低^[12]。与先前报道的女性数据相比,男性中 MKRN3 突变的频率较高^[13]。然而,当仅考虑 CPP 患者时,男性患者(17.6%)中 MKRN3 突变的患病率高于女性患者(5.0%)($P=0.05$)^[14]。女孩的青春期年龄比男孩小,但男孩的发病率较高^[14],有可能表明儿童期 GnRH 的抑制作用弱于女孩,使女孩对青春期发病的紊乱更敏感。MKRN3 基因在小鼠下丘脑弓状核中的表达没有性别差异,这表明在青春期前, MKRN3 在两性中都有抑制作用^[15-16],但不排除有性别特异性作用的可能。

4 MKRN3 基因对青春期时间的影响

4.1 MKRN3 基因和 LIN28B 可能协同调节青春期的时间而影响性早熟

目前发现 MKRN3 与青春期定时相关基因编码的 20 种蛋白质相互作用,其中 LIN28B 是研究最成熟的青春期相关基因之一^[17-18]。LIN28B 与月经初潮年龄、成年身高和儿童期生长有关^[19-20],并且现已知该基因是 let-7 microRNA 的负调节因子^[21],其调节青春期时间的机制尚不清楚^[22-24]。在大鼠和非人类灵长类动物中,在青春期时 LIN28B 的表达在下丘脑中下降^[25],并且在小鼠中, LIN28B 和 MKRN3 的表达在青春期前降低^[26-27]。

然而, Yi 等分析了 LIN28B 中的两个单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs) (rs314276 和 rs314280),发现它们与男孩和女孩的性早熟均没有明显的相关性^[1]。但对患者进行基因检测发现 rs314280 和 rs314276 与性早熟显著相关^[28-29],不过这种相关性并不能在 SNPs 中显示出来^[30-31],推测造成这一结果的原因可能是样本数较少或存在种族差异。

以小鼠为研究对象,通过过表达 LIN28B 对 LIN28-Let-7 途径进行遗传修饰可增加小鼠体重并延缓青春期的开始^[32],但 LIN28B 对于人类青春期的调控方式仍待进一步研究。Venkatram Yella-pragada 通过质谱分析 (Mass spectrometry, MS) 发现人类 LIN28B 和 MKRN3 存在相互作用,并且推测它

们很有可能协同调节青春期的时间^[33]。

4.2 MKRN3 基因不能通过抑制促性腺激素释放激素而调节青春期时间

促性腺激素释放激素 (gonadotropin-releasing hormone, GnRH) 是由下丘脑弓状核分泌的一种十肽激素,由十种氨基酸组成。GnRH 可与垂体促性腺激素细胞膜表面的 GnRH 受体 (GnRHR) 结合,形成配体-受体复合物进入细胞。垂体收到复合物刺激会周期性分泌促性腺激素如黄体生成素 (luteinizing hormone, LH), 卵泡刺激素 (follicle-stimulating hormone, FSH)。黄体生成素和卵泡刺激素会促进性腺分泌性激素,进而对骨骼,肾上腺皮质,乳腺和甲状腺的生长有重要作用。在婴儿期, GnRH 的分泌较活跃,但在儿童期停止,进入青春期后,脉冲式 GnRH 的分泌被重新激活导致促性腺激素的分泌增加,从而刺激性腺。而 MKRN3 可以抑制 GnRH 的分泌,而 MKRN3 的功能缺失性突变会导致其失去对于 GnRH 分泌的抑制作用,使儿童提前进入青春期。

Jeong 发现一些 CPP 患者表现出较高的 MKRN3 水平,高水平的 MKRN3 抑制 GnRH 脉冲分泌通路,但并不直接抑制 GnRH 分泌^[34]。相反, GnRH 脉冲分泌增加也不能负反馈调节 MKRN3 的水平,这些结果表明, MKRN3 不是调节 GnRH 分泌的唯一因子。Venkatram 使用 CRISPR / Cas9 技术生成的两个双等位基因 MKRN3 KO 克隆细胞系 (Del 1 和 Del 2) 检查了 MKRN3 对 GNRH1 表达的作用,并将这些细胞系分化成表达 GNRH1 的神经元。结果显示, Del 1 和 Del 2 细胞系都可以成功地分化为表达 GNRH1 的神经元,这表明 MKRN3 对于分化并不是必要的。有趣的是, Del 1 和 Del 2 细胞系的 GNRH1 表达与对照组没有差异,这表明 MKRN3 不直接改变 GNRH1 表达。虽然 MKRN3 在他们的模型中不影响 GnRH 神经元分化或它们表达 GNRH1 的能力,但 MKRN3 可能通过其他机制调节 GnRH 神经元功能。例如, GnRH 神经元活性的调节主要是通过下丘脑中的 Kisspeptin 和 KNDy 神经元进行的,而 MKRN3 对这些神经元的作用尚不清楚。不能排除其他 MKRN 补偿 Del 1 和 Del 2 细胞系中 MKRN3 缺失的可能性。基于人类多能干细胞 (human pluripotent stem cells, hPSC) 的疾病模型是模拟人类神经元疾病的最接近的方法^[35],但并没有关于 MKRN3 的小鼠模型的相关报道。总之,结果表明 MKRN3 并不是 GnRH 神经元分化过程和人多能干细胞分化期间的 GNRH1 表达的必要因素。此

外, GnRHa 治疗并不会改变女性 CPP 患者 MKRN3 水平^[34]。

5 MKRN3 基因可抑制 Nptx1 神经元的活性影响性早熟

Nptx1 是神经元发育的重要分泌蛋白, 虽然目前并没有直接证据表明 Nptx1 在 GnRH 神经元活动中发挥作用, 但在研究中发现 GnRH 神经元的诱导下 Nptx1 是最早激活的细胞外信号之一^[36]。MKRN3 基因编码 E3 泛素-蛋白连接酶 makorin 3 (E3 ubiquitin-protein ligase makorin-3), 有研究发现 Nptx1 需要该酶进行泛素化修饰。

有研究结果表明, 在青春期之前和青春期时, 小鼠下丘脑 MKRN3 和 Nptx1 呈负相关, MKRN3 可抑制 Nptx1 的活性。MKRN3 通过 Ring finger 结构域与 Nptx1 相互作用, Ring finger 结构域是 E3 泛素连接酶域, 可抑制 Nptx1 表达。由于到目前为止从未报道过 Nptx1 的泛素化, 有研究推测 Nptx1 作为一种分泌蛋白, 不仅可以通过 MKRN3 进行泛素化, 而且可以在青春期开始时和其他 E3 泛素连接酶进行泛素化修饰^[36]。MKRN3 在幼年期通过泛素化对 Nptx1 发挥抑制作用。当青春期开始时, MKRN3 沉默, 导致 GnRH 神经元开始激活 Nptx1 等信号分子。

6 总结与展望

MKRN3 因突变而功能丧失导致幼年期的对 GnRH 的抑制作用缺乏, 进而导致 CPP, 但具体机制及其与其他青春期发病相关锌指基因的相互作用尚不清楚^[37]。高水平的 MKRN3 会抑制 GnRH 脉冲分泌通路, 但并不直接抑制 GnRH 分泌, 表明 MKRN3 不直接改变 GNRH1 表达, 可能存在调节 MKRN3 和 GnRH 分泌的上游因子。此外, MKRN3 还可以作用于神经系统, 通过抑制 Nptx1 的活性而抑制神经元发育, 但其确切的机制仍有待进一步研究。鉴于 MKRN3 在儿童青春期的作用, 补偿 MKRN3 可能是治疗 CPP 的潜在方法, 但具体疗效及可能机制尚需要更深入的研究和考证。

参考文献:

[1] YI BR, KIM HJ, PARK HS, et al. Association between MKRN3 and LIN28B polymorphisms and precocious puberty [J]. BMC Genet, 2018, 19(1): 47.

[2] SUZUKI E, SHIMA H, KAGAMI M, et al. (Epi)genetic defects

of MKRN3 are rare in Asian patients with central precocious puberty [J]. Hum Genome Var, 2019, 6: 7.

- [3] JONG MT, GRAY TA, JI Y, et al. A novel imprinted gene, encoding a RING zinc-finger protein, and overlapping antisense transcript in the Prader-Willi syndrome critical region [J]. Hum Mol Genet, 1999, 8(5): 783-93.
- [4] JONG MT, CAREY AH, CALDWELL KA, et al. Imprinting of a RING zinc-finger encoding gene in the mouse chromosome region homologous to the Prader-Willi syndrome genetic region [J]. Hum Mol Genet, 1999, 8(5): 795-803.
- [5] 刘璐. 中国中枢性性早熟患者 MKRN3 基因突变分析及新突变的生物信息学研究 [D]. 苏州大学, 2018.
- [6] SHIN YL. An update on the genetic causes of central precocious puberty [J]. Ann Pediatr Endocrinol Metab, 2016, 21(2): 66-9.
- [7] KANSAKOSKI J, RAIVIO T, JUUL A, et al. A missense mutation in MKRN3 in a Danish girl with central precocious puberty and her brother with early puberty [J]. Pediatr Res, 2015, 78(6): 709-11.
- [8] MACEDO DB, FRANCA MM, MONTENEGRO LR, et al. Central precocious puberty caused by a heterozygous deletion in the MKRN3 promoter region [J]. Neuroendocrinology, 2018, 107(2): 127-32.
- [9] KIM SH, HUH K, WON S, et al. A significant increase in the incidence of central precocious puberty among Korean girls from 2004 to 2010 [J]. PLoS One, 2015, 10(11): e0141844.
- [10] TEILMANN G, PEDERSEN CB, JENSEN TK, et al. Prevalence and incidence of precocious pubertal development in Denmark: an epidemiologic study based on national registries [J]. Pediatrics, 2005, 116(6): 1323-8.
- [11] BRITO VN, LATRONICO AC, ARNHOLD IJ, et al. Update on the etiology, diagnosis and therapeutic management of sexual precocity [J]. Arq Bras Endocrinol Metabol, 2008, 52(1): 18-31.
- [12] LEE HS, JIN HS, SHIM YS, et al. Low frequency of MKRN3 mutations in central precocious puberty among Korean girls [J]. Horm Metab Res, 2016, 48(2): 118-22.
- [13] GRANDONE A, CAPRISTO C, CIRILLO G, et al. Molecular screening of MKRN3, DLK1, and KCNK9 genes in girls with idiopathic central precocious puberty [J]. Horm Res Paediatr, 2017, 88(3-4): 194-200.
- [14] BESSA DS, MACEDO DB, BRITO VN, et al. High frequency of MKRN3 mutations in male central precocious puberty previously classified as idiopathic [J]. Neuroendocrinology, 2017, 105(1): 17-25.
- [15] ABREU AP, MACEDO DB, BRITO VN, et al. A new pathway in the control of the initiation of puberty: the MKRN3 gene [J]. J Mol Endocrinol, 2015, 54(3): R131-9.
- [16] ANA PAULA A, ANDREW D, MACEDO DB, et al. Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene MKRN3 [J]. N Engl J Med, 2013, 368(26): 2467-75.
- [17] ELKS CE, PERRY JR, SULEM P, et al. Thirty new loci for age at menarche identified by a meta-analysis of genome-wide association studies [J]. Nat Genet, 2010, 42(12): 1077-85.
- [18] AVENDANO MS, VAZQUEZ MJ, TENA-SEMPERE M. Disen-

- tangling puberty: novel neuroendocrine pathways and mechanisms for the control of mammalian puberty[J]. *Hum Reprod Update*, 2017, 23(6): 737-63.
- [19] PERRY JR, STOLK L, FRANCESCHINI N, et al. Meta-analysis of genome-wide association data identifies two loci influencing age at menarche[J]. *Nat Genet*, 2009, 41(6): 648-50.
- [20] COUSMINER DL, BERRY DJ, TIMPSON NJ, et al. Genome-wide association and longitudinal analyses reveal genetic loci linking pubertal height growth, pubertal timing and childhood adiposity[J]. *Hum Mol Genet*, 2013, 22(13): 2735-47.
- [21] HEO I, JOO C, CHO J, et al. Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA[J]. *Mol Cell*, 2008, 32(2): 276-84.
- [22] ABREU AP, KAISER UB. Pubertal development and regulation[J]. *Lancet Diabetes Endo*, 2016, 4(3): 254-64.
- [23] GAJDOS ZK, HENDERSON KD, HIRSCHHORN JN, et al. Genetic determinants of pubertal timing in the general population[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 324(1-2): 21-9.
- [24] CORRE C, SHINODA G, ZHU H, et al. Sex-specific regulation of weight and puberty by the Lin28/let-7 axis[J]. *J Endocrinol*, 2016, 228(3): 179-91.
- [25] SANGIAO-ALVARELLOS S, MANFREDI-LOZANO M, RUIZ-PINO F, et al. Changes in hypothalamic expression of the Lin28/let-7 system and related microRNAs during postnatal maturation and after experimental manipulations of puberty[J]. *Endocrinology*, 2013, 154(2): 942-55.
- [26] ABREU AP, DAUBER A, MACEDO DB, et al. Central precocious puberty caused by mutations in the imprinted gene MKRN3[J]. *N Engl J Med*, 2013, 368(26): 2467-75.
- [27] GRIECO A, RZECZKOWSKA P, ALM C, et al. Investigation of peripubertal expression of Lin28a and Lin28b in C57BL/6 female mice[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2013, 365(2): 241-8.
- [28] HU Z, CHEN R, CAI C. Association of genetic polymorphisms around the LIN28B gene and idiopathic central precocious puberty risks among Chinese girls[J]. *Pediatr Res*, 2016, 80(4): 521-5.
- [29] CAO G, LIU Q, CHU M, et al. Analysis on cDNA sequence, alternative splicing and polymorphisms associated with timing of puberty of Lin28B gene in goats[J]. *Mol Biol Rep*, 2013, 40(8): 4675-83.
- [30] SUNG WON P, SEUNG-TAE L, YOUNG BAE S, et al. LIN28B polymorphisms are associated with central precocious puberty and early puberty in girls[J]. 2012, 55(10): 388-92.
- [31] TOMMISKA J, SORENSEN K, AKSGLAEDE L, et al. LIN28B, LIN28A, KISS1, and KISS1R in idiopathic central precocious puberty[J]. *BMC Res Notes*, 2011, 4: 363.
- [32] ZHU H, SHAH S, SHYH-CHANG N, et al. Lin28a transgenic mice manifest size and puberty phenotypes identified in human genetic association studies[J]. *Nat Genet*, 2010, 42(7): 626-30.
- [33] YELLAPRAGADA V, LIU X, LUND C, et al. MKRN3 interacts with several proteins implicated in puberty timing but does not influence GNRH1 expression[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019, 10: 48.
- [34] JEONG HR, LEE HJ, SHIM YS, et al. Serum Makorin ring finger protein 3 values for predicting central precocious puberty in girls[J]. *Gynecol Endocrinol*, 2019, 35(8): 732-6.
- [35] TELIAS M, BEN-YOSEF D. Modeling neurodevelopmental disorders using human pluripotent stem cells[J]. *Stem Cell Rev*, 2014, 10(4): 494-11.
- [36] LIU H, KONG X, CHEN F. Mkrn3 functions as a novel ubiquitin E3 ligase to inhibit Nptx1 during puberty initiation[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(49): 85102-9.
- [37] LOMNICZI A, WRIGHT H, CASTELLANO JM, et al. Epigenetic regulation of puberty via Zinc finger protein-mediated transcriptional repression[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 10195.

(本文编辑:秦旭平)