

论著·临床研究

先天性甲状腺功能减退症患儿 GNAS 和 THRA 基因突变分析

陈晓宇 刘勇 刘建华 秦晓松

(中国医科大学附属盛京医院检验科, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] **目的** 对70例先天性甲状腺功能减退症(CH)患儿的刺激性G蛋白 α 亚基(GNAS)基因和甲状腺素受体 α (THRA)基因进行二代测序分析,并初步探讨GNAS和THRA基因突变型与CH患儿的临床表现型之间的关系。**方法** 选取70例通过新生儿筛查确诊为CH的患儿,采集外周血并进行DNA样本提取,利用二代测序技术对GNAS和THRA基因进行突变筛查,利用生物信息学软件分析基因突变的致病性。**结果** 70例CH患儿中,3例患儿(4%)检出9种GNAS基因的错义突变(包括3种已知基因突变和6种新突变),4例患儿检出同1种THRA基因多态c.508A>G(p.I170V)。经过生物信息学软件预测和ACMG/AMP指南分析发现2种GNAS基因突变[c.301C>T(p.R101C)、c.334G>A(p.E112K)]致病的可能性大。3例携带GNAS基因突变的患儿存在不同程度的甲状腺功能低下表现。**结论** GNAS基因突变与CH的发病有关,患儿的临床表现存在较大的异质性;THRA基因突变可能与CH的发病无相关性。 [中国当代儿科杂志, 2019, 21(7): 680-684]

[关键词] 先天性甲状腺功能减退症;二代测序;基因突变;儿童

An analysis of GNAS and THRA gene mutations in children with congenital hypothyroidism

CHEN Xiao-Yu, LIU Yong, LIU Jian-Hua, QIN Xiao-Song. Department of Laboratory Medicine, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China (Qin X-S, Email: qinxiaosongsy@126.com)

Abstract: Objective To preliminarily investigate the relationship between stimulatory G protein α subunit (GNAS) and thyroid hormone receptor α (THRA) gene mutations and clinical phenotypes in children with congenital hypothyroidism (CH). **Methods** A total of 70 children with CH diagnosed by neonatal screening were enrolled. Their peripheral blood samples were collected to extract genomic DNA. GNAS and THRA genes were screened for mutations using next-generation sequencing. Bioinformatics software was used to analyze the pathogenicity of gene mutations. **Results** Of the 70 children with CH, nine missense mutations (three known mutations and six novel mutations) in the GNAS gene were detected in three patients (4%), and one gene polymorphism, c.508A>G(p.I170V), in the THRA gene was detected in four patients. The analysis results of bioinformatics software and ACMG/AMP guidelines showed that the two GNAS gene mutations [c.301C>T(p.R101C) and c.334G>A(p.E112K)] were more likely to be pathogenic. Three children with GNAS gene mutations showed different degrees of hypothyroidism. **Conclusions** GNAS gene mutations are related to the development of CH, and children with CH have different clinical manifestations. THRA gene mutations may not be associated with CH. [Chin J Contemp Pediatr, 2019, 21(7): 680-684]

Key words: Congenital hypothyroidism; Next-generation sequencing; Gene mutation; Child

先天性甲状腺功能减退症(congenital hypothyroidism, CH)是新生儿最常见的内分泌代谢障碍性疾病,其发病率达到1:2000~4000^[1],临床表现多样,包括记忆力减退、反应迟钝及皮肤

干燥等,如不能及时诊断和治疗将会导致严重的神经系统发育落后和生长迟缓^[2]。现在CH的诊断和治疗方法比较成熟,通常情况下新生儿的早期筛查试验即可诊断,而左旋甲状腺素的应用也比

[收稿日期] 2019-01-18; [接受日期] 2019-05-30

[作者简介] 陈晓宇,女,硕士研究生。

[通信作者] 秦晓松,女,教授。Email: qinxiaosongsy@126.com。

较广泛,因此避免了严重的临床表现的发生,但是CH的发病机制尚不完全明确,研究已经发现了几种与CH发病相关的致病机制,其中80%~85%为甲状腺发育不良^[3],10%~15%为甲状腺内分泌障碍^[4],5%为中枢性CH^[5],还有一小部分为甲状腺或靶器官反应低下造成的CH^[6]。已有研究表明CH的发病与某些基因突变有关^[7],本文对70例CH患儿的甲状腺或靶器官反应低下的相关基因,包括刺激性G蛋白 α 亚基(stimulatory G protein α subunit,GNAS)基因和人类甲状腺素受体 α (thyroid hormone receptor α ,THRA)基因^[8-9]进行二代测序筛查分析,并初步探讨其基因型与CH患儿临床表现型之间的关系,为CH的新生儿筛查和临床诊断及未来的基因治疗奠定理论基础。

1 资料与方法

1.1 研究对象

本研究选取2017年7月至2018年2月来我院就诊且已经过新生儿筛查确诊为CH的70例患儿进行基因突变筛查分析,其中男36例,女34例,平均年龄为 3.8 ± 2.8 岁。新生儿筛查时检测足跟血,若促甲状腺激素(thyroid stimulating hormone,TSH) ≥ 10 mIU/L,再检测新生儿血清TSH和血清游离甲状腺素(free thyroxine 4,FT4),如TSH水平升高(参考范围:0.30~4.80 μ IU/mL)而FT4水平降低(参考范围:9.01~19.05 pmol/L)则可诊断为CH。所有患儿均经过甲状腺超声检查,其中甲状腺缺如15例,甲状腺发育不良4例,甲状腺异位1例,甲状腺弥漫性肿大4例,甲状腺偏小1例,其余表现为甲状腺发育正常。研究对象均来自于辽宁地区,且来自于70个无血缘关系的家庭。本研究已获得中国医科大学附属盛京医院伦理委员会的批准,血液样本的采集和检测均获得患儿家属的知情同意。

1.2 CH筛查试验

采集出生后3~7 d新生儿的足跟血于滤纸干血片上,利用时间分辨荧光法检测干血片TSH,如干血片TSH ≥ 10 mIU/L,则召回新生儿再利用化学发光微粒子免疫法检测血清TSH和FT4,如TSH水平升高而FT4水平降低则可诊断为CH。

1.3 DNA提取及PCR扩增

抽取70例CH患儿的外周血,按照全血基因组DNA提取试剂盒说明书(北京天根生化科技有限公司)进行DNA提取。取每名患儿10 μ g DNA使用超声波发生器(Covaris S220,Thermo Fisher Scientific,美国)对其进行剪切,选择长度为150~250 bp的片段进行PCR扩增。

1.4 二代测序基因突变筛查

利用试剂盒SureSelect Human All Exon V5 Kit(Agilent,美国)捕获GNAS和THRA基因外显子序列,经过质控评估后利用Illumina HiSeq X ten平台(Illumina,德国)完成二代测序分析。

1.5 生物信息学分析

利用Illumina pipeline CASAVA v1.8.2软件对二代测序所获得的原始数据图像进行转换和分析,然后在文献和Human Gene Mutation Database(HGMD)数据库中查找与CH相关的单核苷酸多态性(SNP)位点,与dbSNP(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>)、1000 Genomes Project(<http://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/>)和Exome Sequencing Project(<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>)等数据库数据进行比对,筛掉最小等位基因频率 >0.05 的突变位点和同义突变。再利用Sorting Intolerant from Tolerant(SIFT,<http://provean.jcvi.org/index.php>)、Polymorphism Phenotyping v2(PolyPhen-2,<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>)和MutationTaster(<http://www.mutationtaster.org/>)软件对筛选出来的错义突变进行致病性预测。最后根据美国医学遗传学和基因组学学院(ACMG)及美国分子病理学协会(AMP)的评估指南对可疑致病基因变异进行致病性分析。

2 结果

2.1 GNAS和THRA基因突变检测结果

在70例CH患儿中,3例检出GNAS杂合子基因突变(表1),在本研究人群中的突变发生率为4%,其中包括3种已知基因突变:c.1225C>G(p.L409V)、c.1412C>G(p.P471R)、c.334G>A(p.E112K),以及6种新的基因突变:c.301C>T(p.R101C)、c.478C>T(p.R160C)、c.433C>T(p.R145C)、c.436C>T(p.R146C)、c.2407C>T(p.R803C)、

c.481C>T(p.R161C); 其中基因突变 E112K 的第 334 位碱基由 G 变成 A, 结果导致该位置基因编码蛋白的第 112 位氨基酸由谷氨酸变成赖氨酸, 以及基因突变 R101C 的第 301 位碱基由 C 变成 T, 结果导致该位置基因编码蛋白的第 101 位氨基酸由精氨酸变成半胱氨酸, 这两个突变位点在 Gs α 蛋

白二级结构中位于 Goloco 结合位点, Goloco 基序构成的调节蛋白可以维持 G 蛋白亚基解离, 当发生基因突变时 Gs α 蛋白的功能受到影响。在 4 例患儿中均检测出同 1 种 THRA 基因多态 c.508A>G(p.I170V) (表 2)。

表 1 CH 患儿的 GNAS 基因突变筛查结果

例序	性别	年龄	确诊时检测结果		甲状腺超声结果	GNAS 基因
			TSH (pmol/L)	FT4 (μ IU/mL)		
1	女	1 岁 9 月	>100	8.12	正常	c.1225C>G(p.L409V) c.1412C>G(p.P471R) c.301C>T(p.R101C) c.478C>T(p.R160C)
2	男	9 岁 5 月	>100	6.29	正常	c.433C>T(p.R145C) c.436C>T(p.R146C) c.2407C>T(p.R803C) c.481C>T(p.R161C)
3	男	8 月	>100	<5.15	正常	c.334G>A(p.E112K)

注: [TSH] 促甲状腺激素; [FT4] 游离甲状腺素。表中的年龄代表患儿入组时的年龄。

表 2 CH 患儿的 THRA 基因突变筛查结果

例序	性别	年龄	确诊时检测结果		甲状腺超声结果	THRA 基因
			TSH (pmol/L)	FT4 (μ IU/mL)		
1	男	3 岁 7 月	34	6.33	正常	c.508A>G(p.I170V)
2	男	1 岁 7 月	>100	<5.15	缺如	c.508A>G(p.I170V)
3	女	6 月	>100	5.73	正常	c.508A>G(p.I170V)
4	女	7 岁 7 月	14.85	<5.15	正常	c.508A>G(p.I170V)

注: [TSH] 促甲状腺激素; [FT4] 游离甲状腺素。表中的年龄代表患儿入组时的年龄。

2.2 GNAS 基因突变生物信息学分析

利用 SIFT、PolyPhen-2 及 MutationTaster 生物学分析软件对筛查出来的 9 种 GNAS 基因突变进行致病性预测分析 (表 3)。在 SIFT 软件评估中, 如基因变异得分 <0.05 则认为有害变异, 否则为可忍受变异; 在 PolyPhen-2 软件评估中, 得分在 0.957~1 之间表示可能性大的有害变异, 得分在 0.453~0.956 之间表示可能性一般的有害

变异, 得分在 0~0.452 之间则表示良性变异; 在 MutationTaster 软件评估中, 预测结果的得分越高说明基因变异的致病性越大。

根据 ACMG/AMP 指南对 9 种 GNAS 基因突变行致病性分析结果显示, 两种基因突变 c.301C>T(p.R101C) 和 c.334G>A(p.E112K) 为可能致病性突变, 其余 7 种为致病性不明确的基因突变, 见表 3。

表3 9种GNAS基因突变的致病性预测

GNAS 基因突变		SIFT	PolyPhen-2	Mutation Taster	ACMG/AMP
核苷酸变化	氨基酸变化				
c.301C>T	p.R101C	有害	良性	致病性	可能致病
c.334G>A	p.E112K	可忍受	可能性大	致病性	可能致病
c.433C>T	p.R145C	有害	良性	致病性	致病性不明
c.436C>T	p.R146C	有害	良性	致病性	致病性不明
c.478C>T	p.R160C	有害	良性	致病性	致病性不明
c.481C>T	p.R161C	有害	良性	致病性	致病性不明
c.1225C>G	p.L409V	有害	良性	致病性	致病性不明
c.1412C>G	p.P471R	有害	良性	致病性	致病性不明
c.2407C>T	p.R803C	有害	良性	致病性	致病性不明

2.3 基因型与表现型的关系

70例患儿在新生儿筛查试验中，干血片TSH均明显升高，在纳入本研究之前经过甲状腺超声检查提示该70例CH患儿表现为甲状腺缺如、甲状腺发育不全、甲状腺肿大或偏小及甲状腺正常。存在GNAS基因突变的3例CH患儿中，1号患儿为足月顺产，甲状腺超声未见异常，新生儿筛查结果显示足跟血TSH>100 pmol/L，出生后1个月开始服用左旋甲状腺素，初始剂量为33.3 μg，该患儿母亲孕期尿碘低曾补充碘剂治疗；2号患儿为足月顺产，新生儿筛查结果显示足跟血TSH为25.4 pmol/L，甲状腺超声未见异常，6岁时仍流涎不止，身材矮小，初始服用左旋甲状腺素剂量为60 μg，随后根据甲状腺功能水平一直调整用药剂量至今；3号患儿为足月剖宫产，甲状腺超声未见异常，新生儿筛查结果显示足跟血TSH为11.9 pmol/L，大便干燥、汗多，初始服用左旋甲状腺素剂量为6.25 μg，后根据甲状腺功能复查结果调整用药剂量，母亲孕期患有甲状腺功能减低症（TSH为3.61 pmol/L）。由此可见，携带不同数量和种类的GNAS基因突变CH患儿的临床表现存在较大的差别，未检测出GNAS基因突变的患儿甲状腺发育情况也各不相同。

3 讨论

CH是最常见的新生儿内分泌障碍性疾病，如果不及时诊断和治疗会导致严重的后果，新生儿筛查技术的开展和左旋甲状腺素的应用已经大大避免了CH患儿严重不良后果的发生，但是CH的

发病机制仍不明确。目前研究证实的发病机制包括甲状腺发育不全、甲状腺内分泌障碍、中枢性CH和甲状腺或靶器官反应低下。近年来的研究发现CH的发病与基因突变有关，本研究纳入70例经新生儿筛查确诊为CH的患儿，针对甲状腺或靶器官反应低下的相关基因，即GNAS基因和THRA基因进行二代测序突变筛查，结果发现4%（3/70）的CH患儿存在可疑致病性GNAS基因突变，而在THRA基因中未发现可疑致病性基因突变。

人GNAS基因位于20q13，包含13个外显子，编码具有内在GTP酶活性的刺激性G蛋白α亚型（G α ）^[10]。G α 可以介导跨细胞膜的信号转导，耦联细胞外受体包括TSH受体、促甲状腺激素释放激素受体、甲状旁腺激素受体等与细胞内的效应蛋白如离子通道、腺苷酸环化酶和磷脂酶C第二信使系统结合^[11]，增强cAMP的合成，G α 蛋白结构激活可以引起甲状腺细胞过度增殖及碘化甲状腺原氨酸分泌过量。当GNAS基因发生突变会导致G α 蛋白活性降低，cAMP表达减少，从而引起TSHR信号通路异常，导致CH的发生^[12]。GNAS基因在人体很多组织中表达，但是在甲状腺组织中的表达量相对更多。Romanet等^[13]报告了1例具有严重临床表现的CH患儿存在GNAS基因表观遗传缺陷，为CH的病因学诊断和发病机制提供了重要的证据。我国尚缺乏GNAS基因突变在CH中的相关研究，在本研究70例CH患儿中检出3例GNAS基因杂合子突变；共检出9种错义突变，包括6种新突变和3种已知突变，通过ACMG/AMP指南分析发现2种基因突变可能为致病性基因突变，分别是c.301C>T(p.R101C)和c.334G>A(p.

E112K)。值得注意的是,3例携带GNAS基因突变的患儿临床表现各不相同,说明基因突变与患儿的临床表现型之间的关系极其复杂。

迄今为止,CH的发病机制尚不明确,我国对CH发病的基因学研究比较广泛,其中甲状腺发育不全和甲状腺内分泌障碍相关的基因突变研究甚多,但是缺乏对甲状腺或靶器官反应低下相关基因的研究。本文对经新生儿筛查确诊为CH的70例患儿进行GNAS和THRA基因二代测序,结果发现THRA基因未检出可疑致病性基因突变,而GNAS基因的突变检出率达到4%,经ACMG/AMP指南分析发现2种基因突变为可能致病性基因突变,说明GNAS基因突变与CH的发病有一定的关联性。

综上所述,本研究CH患儿中GNAS基因的突变发生率相对较高,其基因型与临床表现型存在较大的异质性。为明确GNAS基因与CH发病的相关性,需要扩大样本量及选择不同地区的人群进行筛查,同时需要增加功能实验对GNAS基因突变加以验证,这将为CH的基因诊断、产前筛查、遗传咨询及预后判断等提供更多的科学依据。

[参 考 文 献]

[1] Heidari Z, Feizi A, Hashemipour M, et al. Growth development in children with congenital hypothyroidism: the effect of screening and treatment variables—a comprehensive longitudinal study[J]. *Endocrine*, 2016, 54(2): 448-459.

[2] Liu S, Wang X, Zou H, et al. Identification and characterization of novel PAX8 mutations in Congenital Hypothyroidism (CH) in a Chinese population[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(5): 8707-8716.

[3] Wang F, Liu C, Jia X, et al. Next-generation sequencing of

NKX2.1, FOXE1, PAX8, NKX2.5, and TSHR in 100 Chinese patients with congenital hypothyroidism and athyreosis[J]. *Clin Chim Acta*, 2017, 470: 36-41.

[4] Fu C, Luo S, Zhang S, et al. Next-generation sequencing analysis of DUOX2 in 192 Chinese subclinical congenital hypothyroidism (SCH) and CH patients[J]. *Clin Chim Acta*, 2016, 458: 30-34.

[5] van Tijn DA, de Vijlder JJ, Verbeeten B Jr, et al. Neonatal detection of congenital hypothyroidism of central origin[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(6): 3350-3359.

[6] Sun F, Zhang JX, Yang CY, et al. The genetic characteristics of congenital hypothyroidism in China by comprehensive screening of 21 candidate genes[J]. *Eur J Endocrinol*, 2018, 178(6): 623-633.

[7] Castanet M, Polak M, Bonaiti-Pellié C, et al. Nineteen years of national screening for congenital hypothyroidism: familial cases with thyroid dysgenesis suggest the involvement of genetic factors[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(5): 2009-2014.

[8] Yu B, Long W, Yang Y, et al. Newborn screening and molecular profile of congenital hypothyroidism in a Chinese population[J]. *Front Genet*, 2018, 9: 509-515.

[9] Long W, Lu G, Zhou W, et al. Targeted next-generation sequencing of thirteen causative genes in Chinese patients with congenital hypothyroidism[J]. *Endocr J*, 2018, 65(10): 1019-1028.

[10] Sano S, Nakamura A, Matsubara K, et al. (Epi)genotype-phenotype analysis in 69 Japanese patients with pseudohypoparathyroidism type I[J]. *J Endocr Soc*, 2017, 2(1): 9-23.

[11] Aldred MA, Trembath RC. Activating and inactivating mutations in the human GNAS1 gene[J]. *Hum Mutat*, 2000, 16(3): 183-189.

[12] Lacka K, Maciejewski A. Rare thyroid non-neoplastic diseases[J]. *Thyroid Res*, 2015, 8: 5.

[13] Romanet P, Osei L, Netchine I, et al. Case report of GNAS epigenetic defect revealed by a congenital hypothyroidism[J]. *Pediatrics*, 2015, 135(4): e1079-e1083.

(本文编辑: 万静)