

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2017.01.009

论著 · 临床研究

先天性甲状腺功能减低症患者 DUOXA2 基因突变研究

谭敏沂¹ 黄永兰¹ 李蓓¹ 蒋翔¹ 陈倩瑜¹ 贾雪芳¹ 唐诚芳¹ 刘丽²

(广州市妇女儿童医疗中心 1. 广州市新生儿筛查中心;
2. 遗传与内分泌科, 广东 广州 510180)

[摘要] **目的** 探讨广州地区先天性甲状腺功能减低症(CH)患儿DUOXA2基因突变特点及其基因型与表型的关系。**方法** 采用PCR及直接测序法,对2011年至2012年出生、广州市新生儿筛查中心诊断并排除DUOX2基因突变的20例疑似甲状腺激素合成障碍的CH患者进行DUOXA2基因突变分析。**结果** 20例CH患者中2例为p.Y246X/p.Y246X纯合突变;4例为单等位基因杂合突变:分别为已知致病突变c.413-414insA携带者2例,p.Y246X携带者1例,新突变p.G79R携带者1例。2~3岁再评估时显示,2例p.Y246X/p.Y246X纯合突变者分别表现为暂时性CH及轻度永久性CH;4例单等位基因突变者,除1例p.Y246X携带者表现为典型永久性CH外,其余3例携带者均为暂时性CH。**结论** DUOXA2基因突变是广州地区疑似甲状腺激素合成障碍性CH患儿较常见的分子发病基础,多数表现为暂时性CH,未发现DUOXA2基因型与表型的关系。新突变p.G79R为致病性突变的可能性大。
[中国当代儿科杂志, 2017, 19(1): 59-63]

[关键词] 先天性甲状腺功能减低症; DUOXA2 基因; 突变; 儿童

Characteristics of DUOXA2 gene mutation in children with congenital hypothyroidism

TAN Min-Yi, HUANG Yong-Lan, LI Bei, JIANG Xiang, CHEN Qian-Yu, JIA Xue-Fang, TANG Cheng-Fang, LIU Li. Guangzhou Newborn Screening Center, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou 510180, China (Huang Y-L, Email: xxhuang321@163.com)

Abstract: Objective To investigate the characteristics of DUOXA2 gene mutation and the genotype-phenotype relationship in children with congenital hypothyroidism (CH) in Guangzhou, China. **Methods** A total of 20 CH patients with suspected thyroid dyshormonogenesis who had no DUOX2 gene mutation were enrolled. These patients who were born between 2011 and 2012 were screened and diagnosed with CH in the Guangzhou Newborn Screening Center. PCR and direct sequencing were used to analyze DUOXA2 gene mutation. **Results** Among the 20 patients, 2 had p.Y246X/p.Y246X homozygous mutation; 4 had monoallelic heterozygous mutation, among whom 2 carried the known pathogenic mutation c.413-414insA, 1 carried p.Y246X, and 1 carried a novel mutation, p.G79R. Reevaluation was performed at the age of 2-3 years, and the results showed that the two patients with p.Y246X/p.Y246X homozygous mutation were manifested as transient and mild permanent CH, respectively. Among the four patients with monoallelic heterozygous mutation, the one who carried p.Y246X mutation was manifested as typical permanent CH, and the other three were manifested as transient CH. **Conclusions** DUOXA2 gene mutation is a common molecular pathogenic basis for CH children with suspected thyroid dyshormonogenesis in Guangzhou, and most of them are manifested as transient CH. There is no association between DUOXA2 genotypes and phenotypes. The novel mutation p.G79R is probably a pathogenic mutation. **[Chin J Contemp Pediatr, 2017, 19(1): 59-63]**

Key words: Congenital hypothyroidism; DUOXA2 gene; Mutation; Child

先天性甲状腺功能减低症(congenital hypothyroidism, CH)是由于甲状腺的分化、迁移或

发育过程异常,或者是由于参与甲状腺激素合成过程中的基因突变,造成甲状腺激素合成不足的

[收稿日期] 2016-08-25; [接受日期] 2016-10-13

[作者简介] 谭敏沂,女,硕士,住院医师。

[通信作者] 黄永兰,女,博士,主任医师。

一种最常见的先天性内分泌疾病。我国 CH 的发病率约为 1:2 050^[1], 广州市 2011~2012 年 CH 的发病率为 1:2 779^[2]。近年来研究显示, 甲状腺激素合成障碍所致 CH 的比例呈增高趋势^[3-4], 其中以双氧化酶 2 (dual oxidase 2, DUOX2) 基因突变最常见^[2, 5]。自 2008 年意大利学者 Zamproni 等^[6]首次报道双氧化酶成熟因子 2 (dual oxidase maturation factor 2, DUOXA2) 基因突变性 CH 以来, DUOXA2 与 CH 的关系越来越受到关注。本研究在前期 CH 分子流行病学研究基础上^[2], 对 DUOX2 基因检测未发现异常的 20 例疑似甲状腺激素合成障碍性 CH 患儿进行了 DUOXA2 基因突变分析, 探讨广州地区 DUOXA2 基因的突变特点、基因型与表型的关系。

1 资料与方法

1.1 研究对象

广州市新生儿筛查中心按照“先天性甲状腺功能减低症诊疗共识”^[1]对广州市 2011 年 1 月 1 日至 2012 年 12 月 31 日出生的 433 578 例新生儿进行了 CH 筛查, 确诊 CH 156 例, 其中疑似甲状腺激素合成障碍性 CH 118 例 (复查时甲状腺超声提示甲状腺正常或肿大者), 本研究在前期研究 (96 例疑似甲状腺激素合成障碍性 CH 患儿中 60 例存在 DUOX2 基因突变、2 例确诊为 TPO 基因突变所致永久性 CH)^[2]基础上, 对其余 34 例 CH 患儿中的 20 例 (59%, 20/34) 进行 DUOXA2 基因突变分析, 其中男 13 例、女 7 例, 无血缘关系。纳入标准: (1) 新生儿干血滴纸片检测促甲状腺激素 (bsTSH) ≥ 9 mIU/L; (2) 1 个月内复查血清促甲状腺激素 (sTSH) > 15.00 mIU/L (4~30 天龄参考值: 0.47~10.00 mIU/L)、游离甲状腺素 (FT4) < 15.00 pmol/L (参考值: 12.00~29.34 pmol/L), 超声提示甲状腺正常或肿大 (校正椭圆法甲状腺体

积^[7], 新生儿甲状腺体积参考值: 0.6 ± 0.2 mL);

(3) 甲状腺球蛋白 (TG) 正常或增高 (参考值: 3.50~77.00 ng/mL); (4) 甲状腺自身免疫抗体 TGAbs、TPOAbs 均为阴性。随机选取 50 例无血缘关系、广州市 2011~2012 年出生、CH 筛查阴性的干血滤纸样本作为对照, 用于新突变验证。本研究获得广州市妇女儿童医疗中心伦理委员会批准及患儿监护人知情同意。

1.2 基因组 DNA 提取

采集外周静脉血 2 mL 或干血滤纸标本, 采用厦门致善生物科技有限公司 Lab-Aid 核酸分离试剂盒提取基因组 DNA。

1.3 DUOXA2 基因突变分析

根据 NCBI 数据中 DUOXA2 基因系列 (NM_207581.3), 应用引物设计软件 Primer 5.0 设计 6 对引物 (表 1), 扩增 DUOXA2 基因所有外显子及其两侧侧翼序列, 引物由北京六合华大基因股份有限公司合成。PCR 反应体系: 10 \times Buffer (Mg²⁺ plus) 2.5 μ L, dNTP Mixture (各 10 mmol/L) 2.0 μ L, ExTaq 聚合酶 (2.5 IU/ μ L) 0.125 μ L, 上下游引物 (10 pmol/ μ L) 各 0.5 μ L, 模板 DNA (80~100 ng) 2.0 μ L, 加去离子水至 25 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 64 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10 min。扩增产物送至北京六合华大基因股份有限公司进行纯化、双向测序 (ABI3730 测序仪)。测序结果通过 DNAMAN 及 Chromas 软件与正常参考序列进行比对分析。发现突变则与人类基因突变数据库 (HGMD)、千人基因组数据库、单核苷酸多态性数据库 (dbSNP) 以及近期文献进行突变位点的查找, 明确是否为已报道突变或多态性; 新突变在 50 例对照样本中进行检测, 对新错义突变进行 10 个不同物种突变位点的氨基酸保守性分析, 并进行 SIFT 和 PolyPhen-2 软件蛋白质功能预测。

表 1 DUOXA2 基因 PCR 引物及扩增片段长度

片段	上游引物 (5' \rightarrow 3')	下游引物 (5' \rightarrow 3')	片段长度 (bp)
1	GGAAAGTAACGGCTACAGACAGTG	CACTCCACCTGAGCCTCAATTC	537
2	TGTTAGGGTAGATGGGAAATGGG	AGAGTGGGAAGAGGGAGCAGA	391
3	GCACCTGGGACAATAGGGAACCT	CGCAACTAAGCGGATTCAGACA	554
4	CTGAATCCGCTTAGTTGCCGAGGT	GGATCTTCTAACCCGCGAGGCT	432
5	TTGACGCTGGGGTAGGGATAAAG	CTCCCGCCACACACCTCTAATC	545
6	AAGGGTTTGGTGTCTTGCCGTGT	ACTTTCCTGGTGCCTGCGG	575

1.4 再评估

所有 CH 患儿 2~3 岁时试停左旋甲状腺素 1 个月，复查甲状腺超声及血清 TSH、FT₄ 及 TG 水平。根据血清 TSH 及 FT₄ 水平判断临床转归：(1) 暂时性 CH，TSH 及 FT₄ 正常；(2) 永久性 CH，TSH>15 mIU/L 伴 FT₄<15 pmol/L 为典型的永久性 CH，继续左旋甲状腺素替代治疗；如果 TSH 轻度增高 (TSH 7~15 mIU/L) 伴 FT₄ 正常，考虑为轻度的永久性 CH，定期随访观察，必要时再次替代治疗。

2 结果

2.1 DUOXA2 基因分析

在 20 例 CH 患儿中，6 例检出 DUOXA2 基因突变，均无甲状腺相关疾病家族史，其中 2 例为已知突变：c.738C>G(p.Y246X) 纯合突变；4 例为携带者，分别为已知突变 c.413-414insA(p.Y138X) 2 例，p.Y246X 及新突变 c.235G>C (p.G79R) 携带者各 1 例，见图 1。新突变 p.G79R 在 50 例对照组中未检出，10 种不同物种氨基酸保守性分析提示新突变的氨基酸甘氨酸 (G) 高度保守 (图 2)，SIFT 及 PolyPhen2 软件预测评分分别为 0 和 0.997，均提示该突变影响蛋白质功能，致病可能性大。

2.2 DUOXA2 基因型与表型的关系

6 例 DUOXA2 基因突变患儿新生儿筛查时 TSH>10 mIU/L，生后 1 个月内复查甲状腺功能提示血清 FT₄ 减低伴 sTSH 显著增高，超声检查显示 4 例伴有甲状腺肿大。2~3 岁再评估显示：暂时性 CH 4 例，轻度及典型永久性 CH 各 1 例。

2 例 p.Y246X 纯合突变患儿临床转归分别为暂时性 CH (P1) 和轻度永久性 CH (P2)，P2 再评估后停药随访 1 年，sTSH 在 7~9.9 mIU/L、FT₄ 正常，因 TG 显著增高，再次给予小剂量左旋甲状腺素替代治疗；4 例携带者患儿中，除 p.Y246X 携

带者 (P3) 表现为典型的永久性 CH 表型外，其余 3 例均为暂时性 CH。见表 2。

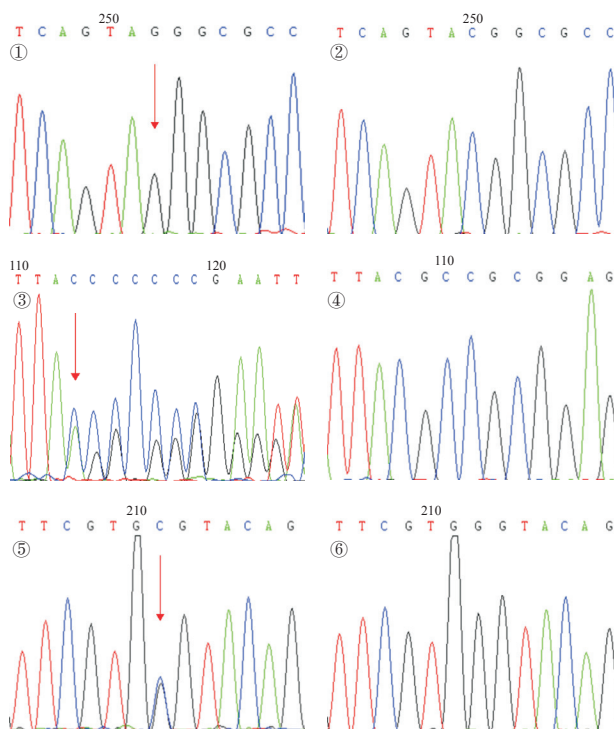


图 1 6 例 CH 患儿 DUOXA2 基因突变的不同类型及正常对照测序图 ①、②分别为 c.738C>G(p.Y246X) 纯合突变及正常对照；③、④分别为 c.413-414insA(p.Y138X) 杂合突变及正常对照；⑤、⑥分别为新突变 c.235G>C(p.G79R) 杂合突变及正常对照。箭头所指为突变位点。

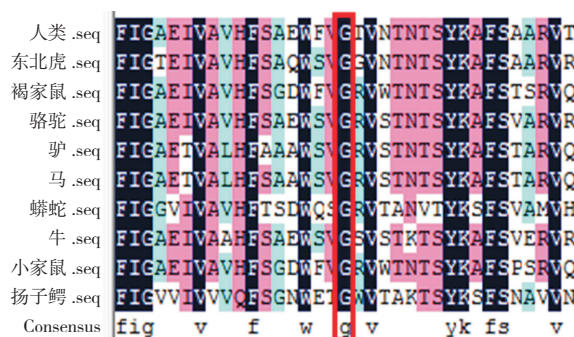


图 2 新突变 p.G79R 的氨基酸保守性分析 p.G79R 的突变氨基酸 (G) 在 10 种不同物种间高度保守。

表 2 6 例 DUOXA2 基因突变的 CH 患儿的基因型及临床表型特征

编号	性别	筛查		确诊		再评估			DUOXA2 基因型	
		bsTSH (mIU/L)	sTSH (mIU/L)	FT ₄ (pmol/L)	甲状腺超声	TG (ng/mL)	sTSH (mIU/L)	FT ₄ (pmol/L)		临床转归
P1	男	72.6	>75.0	<3.9	肿大	80.0	1.2	22.3	暂时性 CH	p.Y246X/p.Y246X
P2	男	26.2	33.4	9.9	正常	239.5	9.9	16.9	永久性 CH	p.Y246X/p.Y246X
P3	女	11.3	35.0	10.5	肿大	40.9	15.9	14.8	永久性 CH	p.Y246X
P4	男	25.8	16.3	9.1	肿大	—	3.3	21.0	暂时性 CH	c.413-414insA
P5	女	11.3	>75.0	<3.9	肿大	22.3	4.2	12.3	暂时性 CH	c.413-414insA
P6	男	92.5	39.3	9.6	正常	无	4.1	19.8	暂时性 CH	p.G79R*

注：* 示新突变。[bsTSH] 干血滴纸片检测促甲状腺激素；[TG] 甲状腺球蛋白；[CH] 先天性甲状腺功能减低症。

3 讨论

DUOXA2 蛋白是内质网上的一种固有蛋白，对产生 H₂O₂ 的关键酶 DUOX2 的转运、成熟及定位均发挥重要作用。DUOX2/DUOXA2 系统中任何成员异常均会影响 H₂O₂ 的合成，进而影响甲状腺过氧化物酶（TPO）的碘有机化过程，从而导致甲状腺激素合成障碍。

人类 DUOXA2 基因定位于染色体 15q21.1，长约 1.5 kb，含有 6 个外显子，编码 320 个氨基酸^[8]，呈常染色体隐性遗传。迄今为止，HGMD (<http://www.hgmd.org>) 已收录了 10 种 DUOXA2 基因致病性突变，其中包括 6 种错义突变、1 种无义突变、1 种剪接突变、1 种大片段缺失突变及 1 种插入突变。无义突变 c.738C>G (p.Y246X) 是中国人 DUOXA2 基因的最常见突变，该突变导致编码蛋白的第 5 跨膜螺旋和 C 端胞内结构域缺失，体外实验证实该突变导致 DUOXA2 蛋白功能的完全丧失^[6]。Zamproni 等^[6]首次报道 1 名中国籍女性患者为 p.Y246X 纯合突变，临床表现为轻度的永久性 CH，其携带杂合突变的父母及同胞表型正常。Liu 等^[9]报道了 1 例经新生儿筛查确诊的 p.Y246X 纯合突变所致的 CH 患者，伴甲状腺肿大，2 岁试停左旋甲状腺素 1 个月再评估时表现为轻度永久性 CH。本研究共发现 3 例患儿携带 p.Y246X 突变，其中 2 例 p.Y246X 纯合突变的患儿临床转归分别为暂时性 CH 和轻度永久性 CH，而携带 p.Y246X 杂合突变的患儿表现为永久性 CH。

c.413-414insA(p.Y138X) 为插入移码突变，导致第 138 密码子 TAC 转变为终止密码 TAA，使 DUOXA2 蛋白缩短 183 个氨基酸。2013 年我国学

者 Yi 等^[10]首先报道了该突变。随后，韩国学者 Park 等^[5]对 112 例新生儿 CH 患者及 58 例门诊随访的 CH 患者进行了 DUOX2 与 DUOXA2 等基因的筛查，发现 9 例患者携带 c.413-414insA 突变，其中 7 例为 c.413-414insA 单等位基因杂合突变，2 例为同时携带 DUOXA2 其他等位基因突变的复合杂合突变。目前尚未见 c.413-414insA 缺陷患者临床转归的文献资料。本研究显示，2 例 c.413-414insA 携带者均为暂时性 CH。

新突变 c.235G>C(p.G79R) 导致 235 位核苷酸发生 G>C 转换，使第 79 密码子由非极性甘氨酸变为极性精氨酸。该突变在 HGMD 数据库、千人基因组计划数据库、dbSNP 数据库及正常对照组均未检出，其突变氨基酸甘氨酸 (G) 在 10 种不同物种中高度保守，SIFT 及 PolyPhen2 软件预测，均提示该突变影响蛋白质功能，故 p.G79R 致病性可能性极大。

DUOXA2 基因呈常染色体隐性遗传，但临床资料证实，DUOXA2 单等位基因突变与 CH 发病有关^[5,9]。本研究进一步证实，DUOXA2 基因双位点或单位点突变均可表现为暂时性 CH 或永久性 CH，即使是相同的基因型（如 p.Y246X 纯合突变），其临床表型仍存在差异。DUOXA2 基因突变的 CH 患者临床表型存在明显异质性的原因可能与以下几个因素有关：（1）体内存在着 DUOXA1 替代途径^[8]，DUOXA1 表达约占 DUOXA2 的 1/5，当 DUOXA2 蛋白活性丧失，DUOXA1 蛋白能部分代偿^[6]；（2）环境因素，如碘缺乏或碘过多均可影响甲状腺激素的合成；（3）可能存在与 CH 相关的其他基因突变共存，例如与 TPO、TG、TSHR 等基因的突变共存。另外，由于一代测序方法的

局限性, 携带 DUOX2 基因单等位基因突变的患儿可能存在发生在非编码区的另一等位基因的突变。

本研究在团队前期 CH 分子流行病学研究基础上^[2], 对 DUOX2 基因检测未发现异常的 20 例疑似甲状腺激素合成障碍性 CH 患儿进行了 DUOX2 基因突变分析, 6 例检出 DUOX2 基因突变。由此推测, 广州地区 DUOX2 基因突变所致新生儿 CH 的发病率约为 1:36 131。

综上所述, DUOX2 基因突变在广州地区疑似甲状腺激素合成障碍性 CH 患儿中较常见, DUOX2 基因单位点突变或双位点突变均可导致暂时性 CH 及不同程度的永久性 CH。新突变 p.G79R 为致病性突变的可能性大。明确 CH 病因, 对指导治疗、预测疾病转归等可提供参考。

[参 考 文 献]

- [1] 中华医学会儿科学分会内分泌遗传代谢学组, 中华预防医学会儿童保健分会新生儿疾病筛查学组. 先天性甲状腺功能减低症诊疗共识 [J]. 中华儿科杂志, 2011, 49(6): 421-424.
- [2] Tan M, Huang Y, Jiang X, et al. The Prevalence, clinical, and molecular characteristics of congenital hypothyroidism caused by DUOX2 mutations: A population-based cohort study in Guangzhou [J]. Horm Metab Res, 2016, 48(9): 581-588.
- [3] Hashemipour M, Ghasemi M, Hovsepian S, et al. Etiology of congenital hypothyroidism in Isfahan: Does it different[J]. Adv Biomed Res, 2014, 3: 21.
- [4] Albert BB, Cutfield WS, Webster D, et al. Etiology of increasing incidence of congenital hypothyroidism in New Zealand from 1993-2010[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2012, 97(9): 3155-3160.
- [5] Park KJ, Park HK, Kim YJ, et al. DUOX2 mutations are frequently associated with congenital hypothyroidism in the Korean population [J]. Ann Lab Med, 2016, 36(2): 145-153.
- [6] Zamproni I, Grasberger H, Cortinovis F, et al. Biallelic inactivation of the dual oxidase maturation factor 2 (DUOX2) gene as a novel cause of congenital hypothyroidism [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2008, 93(2): 605-610.
- [7] 陈文敏, 邱文慧, 黄永兰, 等. 新生儿先天性甲状腺功能低下症的超声特征分析 [J]. 临床超声医学杂志, 2016, 18(7): 467-469.
- [8] Grasberger H, Refetoff S. Identification of the maturation factor for dual oxidase. Evolution of an eukaryotic operon equivalent [J]. J Biol Chem, 2006, 281(27): 18269-18272.
- [9] Liu S, Liu L, Niu X, et al. A novel missense mutation (I26M) in DUOX2 causing congenital goiter hypothyroidism impairs NADPH oxidase activity but not protein expression [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2015, 100(4): 1225-1229.
- [10] Yi RH, Zhu WB, Yang LY, et al. A novel dual oxidase maturation factor 2 gene mutation for congenital hypothyroidism[J]. Int J Mol Med, 2013, 31(2): 467-470.

(本文编辑: 俞燕)

· 消息 ·

本刊关于实验动物样本数的规定

为了提高杂志的学术质量, 《中国当代儿科杂志》决定从 2016 年 8 月起, 对凡是在本刊刊出的动物实验研究论文中实验动物样本数做出如下规定, 请广大作者注意并严格执行。对于未达到以下要求的动物实验性文章投稿, 本刊则一律不再接收。

- (1) 活体动物实验每组动物数不得少于 8 只;
- (2) 对于细胞或分子水平检测方法, 可适当放宽对样本数的要求, 如: PCR 法检测 mRNA 水平, 每个单元组的样本数不得少于 6 例; Western blot 法检测蛋白水平, 每个单元组的样本数不得少于 3 例;
- (3) 组织切片, 要求每个样本组织的切片数不得少于 3 张, 每张切片随机观察视野不得少于 5 个。

《中国当代儿科杂志》编辑部
2016 年 8 月