

21-羟化酶基因缺乏症的家系报道

张 丽,刘 翔,刘 萍[△]

(宁夏医科大学总医院内分泌科,银川 750004)

摘要:目的 通过对 1 个 21-羟化酶缺乏症家系进行 CYP21 基因检测,探讨该家系中 CYP21 基因突变的种类和特点。**方法** 收集该家系中 2 例患者及部分家系成员外周血,提取基因组 DNA,根据 CYP21 基因与假基因序列特异性差异,设计 5 对高度特异引物扩增 CYP21 基因,进行聚合酶链反应后直接测序。**结果** 该家系中 2 例患者共检测到 2 种基因突变,分别为 I172N、Q318X 杂合突变,其中 Q318X 来源于父亲,I172N 为自发突变。**结论** 21-羟化酶基因突变中部分点突变可导致严重后果,对该类患者家系进行基因突变检测,不仅为诊断提供直接依据,而且能指导遗传咨询,具有重要的临床意义。

关键词:先天性肾上腺皮质增生症; 21-羟化酶缺乏症; 基因诊断

中图分类号:R586.9

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)04-0478-04

A family report of 21-hydroxylase gene deficiency

ZHANG Li,LIU Xiang,LIU Ping[△]

(Department of Endocrinology,General Hospital of Ningxia Medical University,Yinchuan,Ningxia 750004,China)

Abstract: Objective To investigate the types and characteristics of CYP21 gene mutation by conducting the CYP21 gene detection in 1 family of 21-hydroxylase deficiency. **Methods** The peripheral blood samples in 2 patients and partial family members of this family were collected for extracting genomic DNA. The five pairs of highly specific primers were designed for amplifying CYP21 gene according to the specific difference between CYP21 gene and its pseudogene sequence. The direct sequencing was performed after PCR. **Results** The two types of gene mutation were detected in 2 patients of this family, which were 172N and Q318X heterozygous mutation respectively, in which Q318X was from the father, and I172N was spontaneous mutation. **Conclusion** In CYP21 mutation, some point mutations can lead to serious consequences. Conducting the gene mutation detect in the family of these patients can not only provide the direct basis for diagnosis, but also can guide the genetic consultation, and has an important clinical significance.

Key words: congenital adrenal hyperplasia; 21-hydroxylase deficiency; genetic diagnosis

先天性肾上腺增生症(CAH)是一种常染色体隐性遗传病,由于编码皮质激素合成途径的必需酶基因缺陷导致肾上腺皮质类固醇激素合成障碍,是引起两性畸形最常见的病因^[1]。其中,21-羟化酶(CYP21)基因缺陷最常见,占 CAH 的 90%~95%^[2],临床分为失盐型、单纯男性化型和非经典型。21-羟化酶缺陷症(21-OHD)可引起休克、低血钠及高血钾等严重的临床表现,危及患者生命。目前研究 CYP21 基因突变类型主要有以下几种:全基因缺失或部分缺失占 15%左右,中大片段转位占 10%左右,点突变(包括小片段缺失和单个碱基置换)占 75%左右^[3]。国内检测常见的突变包括 9 种:Del(全基因缺失)、Exon3 Del8 bp(3 号外显子 8 bp 缺失)、Q318X、R356W、Exon6 Clus-

ter、i2g、I172N、P30L 和 V281L,大部分患者致病基因来自父母遗传,极少发现新发生突变。本研究收集来自同 1 家庭的 2 例患者,通过对患者及其家系部分成员进行基因检测,探讨该家系基因突变的类型及特点,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 患者 1,女性,于 2010 年 3 月 11 日足月顺产,出生时体质量、身高不详。出生后患者父母发现其阴蒂较健康人肥大,未予重视。此后阴蒂生长迅速,自小身高较同龄儿高,嗓音粗,性格外向,好动。查体:血压 100/60 mm Hg,身高 126.5 cm、体质量 26 kg,眉毛浓密,体毛增多,前额及面部痤疮明显,乳房未发育,外阴表现为女性,阴毛稀疏,会阴部阴道

口、尿道口位置正常,外生殖器 Tanner I 期,有明显生长加速趋势。患者 2 与患者 1 系亲生姐妹,表现与其相似,父母非近亲结婚。患者 2 于 1996 年 10 月 26 日出生,19 岁,出生时父母发现阴蒂肥大,儿童期身高较同龄儿生长迅速,13 岁至今身高无明显增长。8 岁时在西安交通大学第一附属医院行阴蒂缩小术,术后服用氢化可的松治疗约半年后自行停药,此后 10 年未再服用糖皮质激素,未再次复查。查体:血压 110/70 mm Hg,身高 156 cm,体质量 48 kg,面部散在痤疮,乳房 TannerⅣ期,外生殖器 TannerⅤ期。于 2014 年 10 月在上海交通大学医学院附属新华医院就诊,复查各项激素后再次开始口服氢化可的松 10 mg, 3 次/日。患者停药期间月经稀发,2~3 次/年,服药后月经恢复正常。在知情同意的原则下(本研究中所

有患者及家系成员均签署知情同意书),对患者及其家系成员进行 CYP21 基因突变的检测。

1.2 方法

1.2.1 提取 DNA 收集用乙二胺四乙酸或肝素抗凝的外周血 5 mL。严格按照 TIANamp 血液基因组 DNA 提取试剂盒说明书步骤提取 DNA,用紫外分光光度计测定产物 DNA 的浓度和纯度,置于-20℃保存。

1.2.2 聚合酶链反应(PCR)扩增 针对 CYP21 基因上的 9 种点突变设计特异性引物(表 1),共进行 5 个 PCR 扩增反应。其中,第 2 对引物针对 CYP21 基因外显子 3 的特殊序列将其与 CYP21A1P 相区别的 8 个碱基设计在引物上,保证了引物的特异性^[4](表 1 中下划线)。

表 1 检测 CYP21 基因点突变的 PCR 引物

引物名称	位置	序列(5'→3')	片段大小(bp)
1F	-7~11	TCTCGCCATGCTGCTCCT	626
1R	633~651	TGGAGGGTGGGAAGTATG	
2F	695~719	CCGGACCTGTCCTTGG <u>GAGACTACT</u>	440
2R	1 188~1 210	AAGTTGTCGTCCTGCCAGAAAAG	
3F	1 188~1 211	CTTTTCTGGCAGGACGACAACCTA	480
3R	1 645~1 667	GAGGCTCTCCTGCAGAGGGTGAA	
4F	1 662~1 681	AGCCTCGTGGCAGGCCAGTG	434
4R	2 073~2 095	TTCGTGGTCTAGCTCCTCCTGCA	
5F	1 854~1 872	CCTGAGGTGCGTCCTGGGG	616
5R	2 449~2 469	GCCTCCACCACATTTTCACGG	

注:CYP21 标准参照序列为 GenBank、GeneID 1589、NG_007941. 2;CYP21A1P 标准参考序列为 GeneID 1590、AL645922. 12;起始密码子 ATG 中 A 的核苷酸位置设定为 1;加下划线部分为 8 bp 缺失

1.2.3 点突变送检测序 测序 PCR 反应体系 50 μL 10×PCR Buffer(含 MgCl₂)5 μL、4×dNTPs 4 μL、上下游引物(10 μmol/L)各 2 μL、cDNA 模板 5 μL、Taq DNA 聚合酶 1 μL、去离子水 31 μL。PCR 反应条件:95℃预变性 5 min,95℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 30 s,共 35 个循环,72℃延伸 3 min。引物 1 T_m 为 59℃,引物 2 和引物 3 T_m 为 61℃,引物 4 和引物 5 T_m 为 58℃,其余反应条件均一致。将扩增产物送上海生工公司进行测序,并与 GenBank 对比,检测点突变。直接测序结果不满意者可进行克隆后再测序。

2 结 果

2.1 2 例患者检测点突变电泳图及测序图 分别将每位患者 5 对引物 PCR 扩增后的片段进行琼脂糖凝胶电泳,同时送上海桑尼公司测序,测序结果与 GenBank 标准序列对比,确认是否发生点突变。直接测序结果不满意者可进行克隆后再测序。见图 1~6。

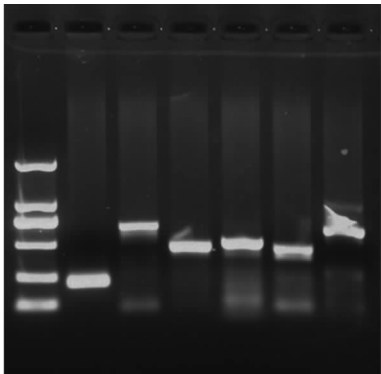
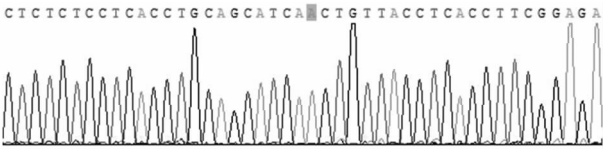


图 1 患者 1 PCR 扩增电泳

2.2 2 例患者基因突变类型及特征 2 例患者均检测到 I172N/Q318X 杂合突变,临床表型均为单纯男性化型,基因型与临床表型完全相符。2 种突变的位置及残余酶的活性见表 2。

2.3 2 例患者家系图谱 Q318X 来源于父亲,I172N 为自发突变,见图 7。



注:此处健康人碱基为 ATC,该患者突变为 AAC,编码的氨基酸发生变化,后续讨论中有详细介绍

图 2 患者 1 外显子 4 Exon 4 I172N 基因突变(ATC→AAC)

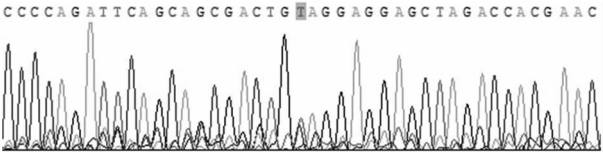


图 3 患者 1 外显子 8 Exon8 Q318X 基因突变(CAG→TAG)

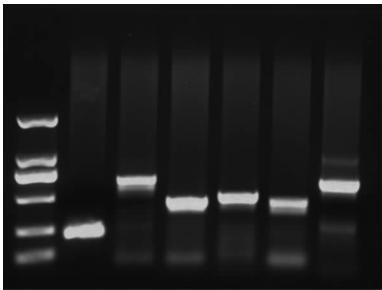


图 4 患者 2 PCR 扩增电泳

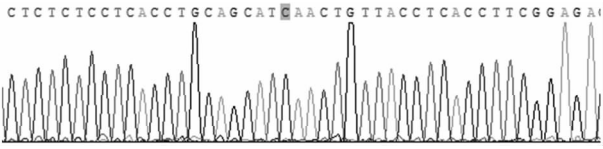


图 5 患者 2 外显子 4 Exon 4 I172N 基因突变(ATC→AAC)

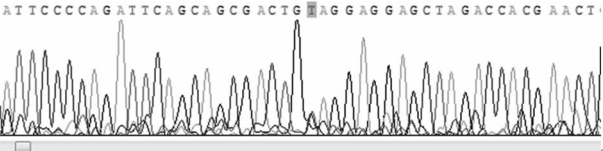


图 6 患者 2 外显子 8 Exon8 Q318X 基因突变(CAG→TAG)

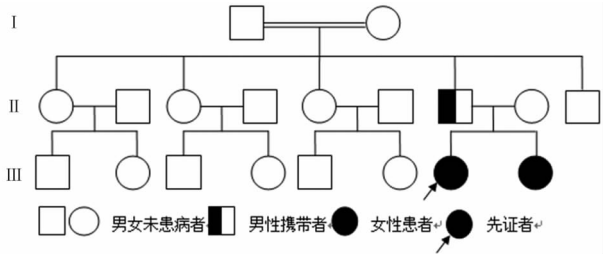


图 7 患者家系图谱

表 2 患者基因突变类型及特征

突变类型	外显子位置	受累等位基因数(<i>n</i>)	残余酶活性(%)
I172N ATC→AAC	Exon4	1	2
Q318X CAG→TAG	Exon8	1	0

3 讨 论

CAH 由于各种酶的缺陷引起皮质醇合成不足,继发下丘脑促生长激素释放激素和垂体促肾上腺皮质激素代偿性分泌增加,导致肾上腺皮质增生^[5]。主要涉及肾上腺皮质激素合成缺陷的酶包括 CYP21、11β-羟化酶、17α-羟化酶、20,22-碳裂解酶、类固醇激素合成急性调节蛋白、3β 羟类固醇脱氢酶^[3]。临床上 21-OHD 最为常见,其次为 11β-羟化酶缺陷症(11β-OHD)和 17α-羟化酶缺陷症(17α-OHD),其他类型均较罕见。CYP21 缺陷导致机体内孕酮、17-羟孕酮不能进一步转化为 11-去氧皮质酮和 11-去氧皮质醇,最终阻碍了糖皮质激素和盐皮质激素的合成而引起相应的一系列临床表现:一方面,皮质醇缺乏会减弱对垂体前叶的负反馈作用,刺激垂体释放大量促肾上腺皮质激素而促进肾上腺皮质增生;另外,由于合成皮质醇的大量前体物质堆积,引起雄激素合成显著增加,最终导致性发育异常^[4,6]。CAH 是一种常染色体隐性遗传病,不同类型酶缺陷会出现不同临床表现,各种类型 CAH 临床表现主要取决于以下 4 个方面:(1)发生缺陷酶的种类;(2)残余酶的活性;(3)终产物缺乏的影响;(4)前体物质堆积产生的激素效应^[7]。CAH 临床表现的严重程度与基因突变导致酶残余活性呈正相关^[4]。

21-OHD 是由于编码类固醇的 CYP21 基因突变所致,CYP21 基因位于 6 号染色体短臂(6p21.3)的 HLAⅢ区,由 10 个外显子组成,全长 8.1 kb^[8]。有研究发现,21-OHD 的合成受 CYP21 基因活性的调控,CYP21 基因位于由 CYP21A 假基因派生的高度同源的假基因的 30 kb 处^[9]。假基因由于缺乏编码 110~112 密码子的 8 个碱基,会产生 1 个没有活性的缩短了的酶,从而导致出现了 1 个终止密码子^[7]。假基因 CYP21A1P 与活性基因 CYP21 同源性高达 98%。减数分裂时,不平衡交叉导致基因缺失,同时基因转位从假基因上转运有害的点突变至活性基因,导致 CYP21 活性完全或部分缺失^[10],基因突变引起酶活性受损程度越大,临床表现则越重^[11]。

21-OHD 临床分为失盐型、单纯男性化型和非经典型,在单纯男性化型中,I172N 是最常见的突变类型,该突变是一种中等程度的突变,是 CYP21 基因外显子 4 上的单个碱基替换所致(ATC→AAC),使编码的异亮氨酸变为天冬酰胺,致使 CYP21 活性只保有野生型的 2.0%~11.0%^[12]。本研究中 2 例患者均检测出 I172N 基因突变,临床表型均为单纯男性化型,而在 21-OHD 中,95% 是由于基因间重组所致,仅有 5% 为自发突变^[13]。本研究中 2 例女性患者父母均未携带 Exon4 I172N 基因突变,故可判断患者 I172N 为自发突变。

21-OHD 为常染色体隐性遗传病,父母双方均携带致病突变时子女才发病,通常携带者没有任何临床症状,这给疾病的诊断带来很大困难。为进一步明确突变来源,对先证者家系进行研究,有助于确定突变的归属,为遗传咨询和产前诊断提供基因诊断侧重点,为优生优育提供更可靠的依据。研究表明,CAH 患者的常见突变亦是该病新发生突变的热点区域,理论上讲,对该患者的下一代进行筛查时,重点检测 Q318X 基因突变即可,但是本研究中涉及的 9 种突变均可能为热点突变区域,在遗传过程中有发生自发突变的可能,故进行遗传咨询时,仍应对该 9 种常见突变进行全面检测,避免下一代中再出现 CAH 患者。

21-OHD 是一种临床表现复杂、多样的疾病,具有基因型与临床表型高度相符的特点^[14],用基因型可预测临床表型,对基因型进行分析有助于理解该病的分子遗传学特征并且能指导遗传咨询,为产前诊断提供依据,还可指导妊娠期治疗,避免女性患儿外生殖器发生男性化改变。基因诊断不仅是针对病因进行检测的方法,亦是遗传咨询和产前诊断唯一可靠的方法,对临床具有重要的指导意义。

参考文献

[1] MA D Y, CHEN Y L, SUN Y, et al. Molecular analysis of the CYP21A2 gene in Chinese patients with steroid 21-hydroxylase deficiency[J]. Clin Biochem, 2014, 47(6): 455-463.

[2] CAVARZERE P, VINCENZI M, TEOFOLI F, et al. Genotype in the diagnosis of 21-hydroxylase deficiency: who should undergo CYP21A2 analysis[J]. J Endocrinol Invest, 2013, 36(11): 1083-1089.

[3] 张波, 陆召麟, 王玥, 等. 不同类型 21-羟化酶缺乏症的临床表型和基因型对比研究[J]. 中国优生与遗传杂志, 2004, 12(4): 14-16.

[4] 张丽, 焦凯, 张菊. 21-羟化酶缺陷症基因诊断方法的建立及应用[J]. 检验医学与临床, 2015, 12(17): 2545-2547.

[5] 梁雁, 罗小平. 非经典型先天性肾上腺皮质增生症诊治现

状[J]. 中国实用儿科杂志, 2016, 31(6): 418-422.

[6] CHARMANDARI E, EISENHOFER G, MEHLINGER S L, et al. Adrenomedullary function May predict phenotype and genotype in classic 21-hydroxylase deficiency[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(7): 3031-3037.

[7] AL-AGHA A E, OCHELTREE A H, AL-TAMIMI M D. association between genotype, clinical presentation, and severity of congenital adrenal hyperplasia: a review[J]. Turk J Pediatr, 2012, 54(4): 323-332.

[8] SPEISER P W, AZZIZ R, BASKIN L S, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2010, 95(9): 4133-4160.

[9] CHEN W Y, XU Z, SULLIVAN A, et al. Junction site analysis of chimeric CYP21A1P/CYP21A2 genes in 21-Hydroxylase deficiency[J]. Clin Chem, 2012, 58(2): 421-430.

[10] TABOAS M, GOMEZ A L, SCAIA M F, et al. Functional studies of p. R132C, p. R149C, p. M283V, p. E431K, and a novel c. 652-2A>G mutations of the CYP21A2 gene[J]. PLoS One, 2014, 9(3): e92181.

[11] XU Z, CHEN W Y, MERKE D P, et al. Comprehensive mutation analysis of the CYP21A2 gene an efficient multistep approach to the molecular diagnosis of congenital adrenal hyperplasia[J]. J Mol Diagn, 2013, 15(6): 745-753.

[12] AUCHUS R J. Management considerations for the adult with congenital adrenal hyperplasia[J]. Mol Cell Endocrinol, 2015, 408(1): 190-197.

[13] MASSIMI A, MALAPONTI M, FEDERICI L, et al. Functional and structural analysis of four novel mutations of CYP21A2 gene in Italian patients with 21-Hydroxylase deficiency[J]. Horm Metab Res, 2014, 46(7): 515-520.

[14] 李媛媛, 王建华, 王金锐. 先天性肾上腺皮质增生症的诊治现状[J]. 中国现代医药杂志, 2010, 12(12): 130-132.

(收稿日期: 2018-08-19 修回日期: 2018-10-30)

(上接第 477 页)

[13] 张智, 陈红霞, 徐晓霞. 血清人附睾蛋白 E4、CA125、CA199 联合诊断子宫内膜癌的价值[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(7): 1108-1111.

[14] CHEN Y, REN Y L, LI N, et al. Serum human epididymis protein 4 vs. carbohydrate antigen 125 and their combination for endometrial cancer diagnosis: a meta-analysis[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(10): 1974-1985.

[15] 刘政宏, 朱正秋, 杨成喜, 等. 人附睾蛋白 4 在非小细胞肺癌组织及血清中的表达及临床意义[J]. 癌症进展, 2016, 14(11): 1132-1134.

[16] 栾梅, 梅雪绯, 翟光宇, 等. 动态监测上皮性卵巢癌患者血清 CA125 水平对疗效及预后的评估价值[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(11): 2080-2082.

(收稿日期: 2018-05-20 修回日期: 2018-09-04)