

论著·临床研究

先天性甲状腺功能减退症患儿 DUOX2 基因突变的研究

柴建¹ 杨晓龙² 郭明贞² 刘璐³ 刘世国⁴ 阎胜利³ 葛银林¹

(1. 青岛大学医学院生物化学与分子生物学教研室, 山东 青岛 266021;
2. 青岛大学附属医院检验科, 山东 青岛 266003; 3. 青岛大学附属医院内分泌科, 山东 青岛 266003;
4. 青岛大学附属医院产前诊断中心, 山东 青岛 266003)

[摘要] **目的** 研究先天性甲状腺功能减退症 (congenital hypothyroidism, CH) 患儿 DUOX2 基因突变类型和特点, 并初步探讨基因型-表现型的关系, 为 CH 患儿的基因诊断和基因治疗提供理论依据。**方法** 从 10 例 CH 伴甲状腺肿大患儿外周血白细胞中提取基因组 DNA, 采用 PCR 扩增和直接测序的方法对 DUOX2 全部外显子进行基因突变检测。**结果** 在 1 例患儿中发现 DUOX2 基因第 28 外显子 cDNA 的 3632 位点发生了 G>A 的突变 (c.G3632A), 导致第 1211 密码子的精氨酸变为组氨酸 (p.R1211H)。在 3 例患儿中发现 DUOX2 基因第 17 外显子 cDNA 的 2033 位点发生了 T>C 的突变 (c.T2033C), 导致第 678 密码子的组氨酸变为精氨酸 (p.H678R)。此两种突变均为杂合型的错义突变。**结论** CH 患儿存在 DUOX2 基因杂合突变, 该杂合突变可能引起蛋白质功能的改变从而导致 CH; 基因型与表现型的关系尚不明确, 需要进一步的研究。

[中国当代儿科杂志, 2015, 17(1): 40-44]

[关键词] 先天性甲状腺功能减退症; DUOX2; 甲状腺肿大; 基因突变; 儿童

DUOX2 mutations in children with congenital hypothyroidism

CHAI Jian, YANG Xiao-Long, GUO Ming-Zhen, LIU Lu, LIU Shi-Guo, YAN Sheng-Li, GE Yin-Lin. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Qingdao University, Qingdao, Shandong 266021, China (Ge Y-L, Email: geyinlin@126.com)

Abstract: Objective To study the features of DUOX2 mutations and genotype-phenotype relationship in children with congenital hypothyroidism (CH), in order to provide evidence for gene diagnosis and gene treatment of CH. **Methods** Blood samples were collected from 10 CH children with thyromegaly. Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes. All exons of DUOX2 gene were analyzed using PCR and direct sequencing. **Results** G3632A mutation in the exon 28 of DUOX2 that may result in arginine to histidine substitution at codon 1211 was found in one patient. T2033C mutation in the exon 17 of DUOX2 that may result in histidine to arginine substitution at codon 678 was found in three patients. They were all heterozygous mutations. **Conclusions** Heterozygous mutations in DUOX2 may affect protein function and cause CH. The relationship between DUOX2 genotypes and clinical phenotypes is unclear and needs further studies.

[Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(1): 40-44]

Key words: Congenital hypothyroidism; DUOX2; Thyromegaly; Gene mutation; Child

先天性甲状腺功能减退症 (congenital hypothyroidism, CH) 是最常见的新生儿内分泌疾病, 发病率约为 1/3000~1/4000^[1]。当甲状腺功能不足时, 可引起代谢障碍、生理功能低下、生长

发育迟缓、智能障碍等, 严重影响新生儿的生长和智力发育。CH 主要由甲状腺激素合成异常 (约 15%) 或甲状腺发育不全 (thyroid dysgenesis, TD, 约 85%) 引起。大量研究表明甲状腺发育不全,

[收稿日期] 2014-07-15; [接受日期] 2014-09-02

[基金项目] 国家自然科学基金 (81170812); 山东省人口和计划生育委员会科技计划项目 (2013) 年第 (5) 号。

[作者简介] 柴建, 男, 硕士研究生。

[通信作者] 葛银林, 男, 教授。

包括缺如(5%)、异位(30%~45%)和发育不良(35%~40%)^[2],与PAX8、甲状腺转录因子1(TTF-1)、甲状腺转录因子2(TTF-2)等甲状腺转录因子^[3]的基因突变有密切关系。另外,甲状腺激素合成异常(临床表现为甲状腺肿大)与影响碘代谢和甲状腺激素合成和分泌等过程的基因突变有关,主要包括甲状腺过氧化酶(TPO)、甲状腺球蛋白(TG)、Na/I同向载体(NIS)、碘酪氨酸脱碘酶(DEHAL1)、双氧化酶2(dualoxidase2, DUOX2)等基因,这些基因突变的遗传方式多为常染色体隐性遗传^[4]。在甲状腺激素合成异常导致CH相关的基因突变中,DUOX2基因突变越来越受到国外学者的关注。

人DUOX2位于染色体15q15.3区域,长度约为22 kb,由34个外显子组成。其翻译的DUOX2前体蛋白由一个氨基酸长度为26的信号肽和随后的1522个氨基酸组成^[5]。DUOX2蛋白是一种在甲状腺滤泡细胞质膜顶部表达的膜蛋白,C端包括一个六次跨膜的 α 螺旋结构和一个FAD与NADPH结合位点,N端包括过氧化物酶样结构及一个跨膜螺旋结构^[6]。DUOX2的得名源于其C端区域与NADPH氧化酶2(NOX2)有50%相似性,且氨基末端为一个过氧化物酶样结构(与TPO有43%相似性)^[7-9]。DUOX2是钙依赖性辅酶II(Ca^{2+} /NADPH)氧化酶的催化活性部分,催化合成过氧化氢(H_2O_2)。国外许多研究证实DUOX2的功能缺失突变会导致甲状腺 H_2O_2 无法生成,最终造成CH^[10]。但目前国内关于DUOX2基因突变的研究很少,本研究选取了10例经新生儿筛查确诊为CH伴甲状腺肿大的患儿作为研究对象,对其基因突变的类型和特点进行分析,为新生儿CH的基因筛查、产前诊断和基因治疗提供一定的理论基础。

1 资料与方法

1.1 研究对象

来自济南市新生儿疾病筛查中心的10例CH

患儿作为研究对象,其中男性6例,女性4例,年龄 7 ± 3 岁。入选标准:新生儿筛查中促甲状腺激素(TSH) $\geq 20 \mu\text{IU/mL}$ 者,再取静脉血测TSH、FT3、FT4,确定CH者进行 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 甲状腺扫描或B超检查,甲状腺位置正常且肿大者。同时区分永久性和暂时性CH,其中7例为伴甲状腺肿大永久性CH,3例为伴甲状腺肿大暂时性CH。该研究获得了青岛大学医学院伦理委员会的批准和患儿家属的知情同意。

1.2 基因组DNA提取

取患儿外周静脉血2 mL置于柠檬酸钠抗凝管,采用TIANGEN产DNA提取试剂盒全血型提取外周血基因组DNA。利用Nanodrop2000微量紫外分光光度计(Thermo Scientific)对提取的DNA进行纯度和浓度检测,显示OD值为1.82~1.98,浓度最低60.0 ng/ μL ,最高368.8 ng/ μL 。

1.3 PCR扩增

利用Primer 5软件设计引物扩增DUOX2所有外显子,由Invitrogen公司合成引物(表1)。PCR反应体系:20 μL PCR反应缓冲液中含200 nM dNTPs,80 ng DNA模板,上、下游引物0.5 μM ,1.25 U Taq聚合酶,1 $\times$ reaction buffer(10 mM Tris HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl_2)。PCR反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性5 min,35个循环中,94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,55~65 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸7 min,降温至4 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.4 PCR扩增产物测序

PCR扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳分离观察PCR产物扩增情况,利用UVP凝胶成像仪进行图像扫描,于相应位置处见单一条带。PCR产物送至上海申速生物有限公司进行直接测序。

1.5 生物信息学分析

用DNAMAN软件和VECTOR NTI软件进行生物信息学分析,将患儿DUOX2基因测序结果与GenBank中DUOX2基因序列进行比对,从中发现患儿DUOX2基因可能存在的新突变位点,为分析中国人群DUOX2基因突变类型和特点提供依据。

表 1 DUOX2 基因的引物及其扩增产物长度

外显子	上游引物	下游引物	片段大小 (bp)	外显子	上游引物	下游引物	片段大小 (bp)
1+2	5-CATAGAGGACG CCCTCAG-3	5-GGGAGCGCATA AGATTGC-3	639	18+19	5-TCTTTCCCTC CCTCTCT-3	5-TTTGAAGGTGA TGCTCT-3	598
3	5-GGGAAGGTTCT GTCAGTGAAGT-3	5-GTTGGGAGTCG GATGGGT-3	385	20	5-CACCTACCCA GCCTGAC-3	5-AAAAATGCCTC TTCCTCT-3	537
4	5-GGACGGTTTGT CACGTATGGC-3	5-GGGGAGGGAC GAGCGGT-3	693	21	5-AAGGGAGGA GGGCCAGT-3	5-CATCCAGCGCA TAGGG-3	322
5+6	5-AGGCCAACCGT GACGG-3	5-CTTGCACGCGA AGGGAG-3	521	22	5-TTCATTTTGT GCCGCC-3	5-CTCAGGATGGT CGCTTAT-3	315
7+8	5-CCCCATCTGTGC AACC-3	5-CCCAAGGCAGC TCATCT-3	672	23	5-ATGGAGCAAAGA CAGAAGAA-3	5-ACATAGCTTGG CACAGG-3	499
9+10	5-GCCACTGCTCAA TCTAG-3	5-GTCCCTTACCAT CCCCC-3	601	24+25	5-CACCTGTGCC AACTGAT-3	5-AGCCCAGGAGA AACCATC-3	580
11	5-CGTAGTGCCAAT AGTCG-3	5-ATCAGTAAATG GGGAAA-3	391	26	5-GCCAGCAGG AAAGGAGTC-3	5-CAAGAGCAGGA TGTAGAGTG-3	528
12	5-GCAGCAAACAT ACGCCAC-3	5-GAATCAGGGCT CATAGGG-3	314	27+28	5-GGGGAATGT GCTGTGTC-3	5-AAGATTTGGCC TCTGTGTC-3	629
13	5-GTGACTTCTAC TTCCTCCAACT-3	5-CCCTGAAACTG TCTCCCTC-3	403	29	5-AGAGGACAG GTGCCATCA-3	5-CAGGACAGCTG CCAAG-3	554
14+15	5-ACAGTTTCAGG GATGG-3	5-TCTGTAACCTGT TCTTTCTC-3	652	30	5-TGTCTCCGTT TCTGCTC-3	5-CCTCAAGTTTG GCATCT-3	379
16	5-GGGACATCTGCT GAATACCC-3	5-TCGCTGACCTT CTGCTT-3	507	31	5-GGCCTCTGCT GGGACTGT-3	5-GCCATCCTGCTT ACGCT-3	394
17	5-AGGCTGAAGCA GGGTC-3	5-CACCGAATCTC ACAACA-3	512	32+33	5-AGTGCTGGC CCGACTGT-3	5-CCTAGGTGGAT TCTGATGGA-3	692

2 结果

2.1 PCR 扩增产物检测结果

所有 PCR 扩增产物经过琼脂糖凝胶电泳鉴定，加入 DNA 标准品作为对照，紫外灯下可见目的片段扩增条带清晰单一，反应产物的长度与所设计的各片段的大小预期值符合，进行 DNA 测序。

2.2 DUOX2 基因所有外显子 DNA 测序结果

10 例 CH 伴甲状腺肿大患儿均进行 DUOX2 基因所有外显子 DNA 测序，在 1 例永久性 CH 患儿中发现 DUOX2 基因第 28 外显子发生了 G>A 的杂合性突变 (c.G3632A)，在 3 例患儿 (2 例永久性 CH 患儿，1 例暂时性 CH 患儿) 中发现

DUOX2 基因第 17 外显子发生了 T>C 的杂合性突变 (c.T2033C)。其他 CH 患儿均未发现 DUOX2 基因的突变。

2.3 生物信息学分析

经过生物信息学分析发现，第 28 外显子突变位于 cDNA3632 (c.G3632A)，导致第 1211 密码子的精氨酸变为组氨酸 (p.R1211H) (图 1)，第 17 外显子突变位于 cDNA2033 (c.T2033C)，导致第 678 密码子的组氨酸变为精氨酸 (p.H678R) (图 2)。同时，在人、小鼠、大鼠、绵羊、猪种群中，利用 DNAMAN 软件进行 DUOX2 蛋白多重序列比对，发现第 28 外显子突变位于相对保守的区域，第 17 外显子突变位于非保守区域。

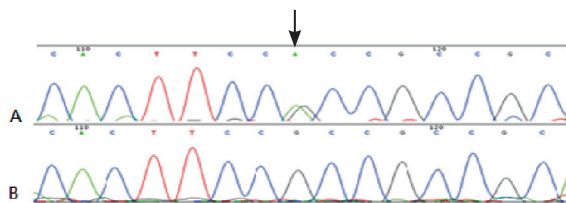


图1 DUOX2第28外显子的部分测序图 A: 基因突变测序图, 突变位点为A/G杂合双峰(箭头所示); B: 正常基因测序图, 为GG纯合。

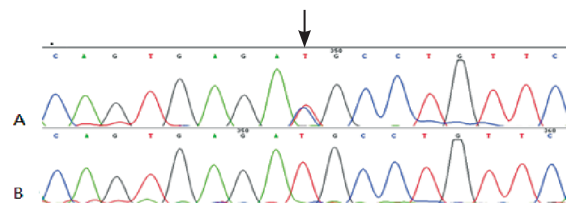


图2 DUOX2第17外显子的部分测序图 A: 突变基因测序图, 突变位点为C/T杂合双峰(箭头所示); B: 正常基因测序图, 为TT纯合。

3 讨论

CH是新生儿最常见的内分泌疾病, 甲状腺激素合成缺陷是CH的致病因素之一。碘的氧化及有机化是甲状腺激素合成的中心环节及限速阶段, 此过程需要TPO和 H_2O_2 的参与。只有在 H_2O_2 存在的条件下, TPO才能将无机碘离子氧化成有机碘, 并催化有机碘与TG中的酪氨酸残基反应生成一碘酪氨酸, 进而产生3,5-二碘酪氨酸。在此过程中 H_2O_2 作为电子受体发挥作用^[11]。 H_2O_2 由DUOX2催化合成, 一旦DUOX2基因发生突变, 造成其功能缺失, 不能正常合成 H_2O_2 , 使碘不能氧化和有机化, 就会造成甲状腺激素合成不足, 最终导致CH的发生。

自从2002年^[12]在CH患者中首次进行DUOX2基因突变研究开始, 迄今为止已经发现了包括错义突变、无义突变、剪接位点突变和缺失突变在内的20多种不同类型DUOX2基因突变。Moreno等^[12]对8例过氯酸盐释放试验为阳性的暂时性CH伴甲状腺肿大患者进行DUOX2基因突变检测, 发现了3例DUOX2基因杂合突变(Q686X, R701X, S965fsX29), 另外在1例永久性CH患者中发现R434X的纯合突变。Vigone等^[10]发现2例碘有机化缺陷的永久性CH患者中存在R842X和R376W的DUOX2复合等位基因突变。Varela等^[13]对17例碘转运缺陷的CH患者中也发现1例携带有DUOX2复合等位基因突变的永久性CH患者, 其突变为p.Q36H/p.S965fsX29, 该患者是由于Q36H突变使DUOX2活性完全丧失而引起的永久性CH。根据以上报道, 研究人员曾初步推测DUOX2基因型与表现型的关系, 即DUOX2基因单等位基因杂合突变可引起暂时性CH及复合等位基因突变可引起永久性CH。但后来, 随着病例报道的增加, 基因型-表现型的关系与该预测

的情况相比, 越来越复杂。Pfarr等^[14]报道了1例暂时性CH伴甲状腺肿大患者存在复合等位基因杂合突变(ins602 g-fsX300/D506N), 其父亲携带ins602 g杂合突变, 但甲状腺功能正常, 而未表现出临床症状的母亲和一个兄弟也携带有突变(D506N)。此外, 据Chiesa等^[15]报道, 在一个日本家系中, 有4个同胞兄弟姐妹具有复合等位基因突变(L479SfsX2/K628RfsX10), 其中3人为暂时性CH, 临床表现为出生时甲状腺激素水平低, 甲状腺轻度肿大, 7、9岁时L-T4治疗终止后, 甲状腺功能测定均正常。第四个同胞出生时TSH水平暂时较高, 2个月后在停止L-T4治疗的情况下却有所降低。同时, Maruo等^[16]在2例暂时性CH患者中也发现了两例复合杂合突变(H678R/L1067S; A649E/R885Q)。

卢德国等^[17]曾从山东沿海地区选取了10例暂时性CH伴甲状腺肿大患儿, 进行DUOX2基因突变筛查, 在1例CH患儿中发现DUOX2基因单个等位基因的杂合性突变(c.C2101T), 该突变导致第701密码子精氨酸变为终止密码(p.R701X), 该突变为无义突变。本研究选取的研究对象来自山东内陆地区(济南地区), 且患儿临床表型多为永久性CH伴甲状腺肿大。本研究对10例CH伴甲状腺肿大患儿进行DUOX2基因所有外显子DNA测序, 结果发现两种DUOX2基因单个等位基因的杂合性突变, 分别是第28外显子突变位于cDNA3632(c.G3632A), 导致第1211密码子的精氨酸变为组氨酸(p.R1211H), 以及第17外显子突变位于cDNA2033(c.T2033C), 导致第678密码子的组氨酸变为精氨酸(p.H678R), 均为错义突变。精氨酸为脂肪族氨基酸, 组氨酸为杂环族氨基酸, 基因突变导致的氨基酸的改变可能导致蛋白质空间结构的改变, 结构决定功能, 因此本研究所发现突变可能会导致蛋白质功能的

改变,是否为致病突变需要进一步做功能试验验证。本研究所发现突变均为杂合性突变,研究结果提示 DUOX2 基因单个等位基因突变可能引起蛋白质功能的改变而导致 CH。

[参 考 文 献]

- [1] De Felice M, Di Lauro R. Thyroid development and its disorders: genetics and molecular mechanisms[J]. *Endocr Rev*, 2004, 25(5): 722-746.
- [2] Vilain C, Rydlewski C, Duprez L, et al. Autosomal dominant transmission of congenital thyroid hypoplasia due to loss-of-function mutation of PAX8[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001, 86(1): 234-238.
- [3] Van Vliet G. Development of the thyroid gland: lessons from congenitally hypothyroid mice and men[J]. *Clin Genet*, 2003, 63(6): 445-455.
- [4] Rubio IG, Galrao AL, Pardo V, et al. A molecular analysis and long-term follow-up of two siblings with severe congenital hypothyroidism carrying the IVS30+1G>T intronic thyroglobulin mutation[J]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2008, 52(8): 1337-1344.
- [5] Morand S, Agnandji D, Noel-Hudson MS, et al. Targeting of the dual oxidase 2 N-terminal region to the plasma membrane[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(29): 30244-30251.
- [6] Moreno JC, Pauws E, van Kampen AH, et al. Cloning of tissue-specific genes using serial analysis of gene expression and a novel computational subtraction approach[J]. *Genomics*, 2001, 75(1-3): 70-76.
- [7] De Deken X, Wang D, Many MC, et al. Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family[J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(30): 23227-233.
- [8] Dupuy C, Kaniewski J, Deme D, et al. NADPH-dependent H₂O₂ generation catalyzed by thyroid plasma membranes. Studies with electron scavengers[J]. *Eur J Biochem*, 1989, 185(3): 597-603.
- [9] Dupuy C, Virion A, De Sandro V, et al. Activation of the NADPH-dependent H₂O₂-generating system in pig thyroid particulate fraction by limited proteolysis and Zn²⁺ treatment[J]. *Biochem J*, 1992, 283(Pt 2): 591-595.
- [10] Vigone MC, Fugazzola L, Zamproni I, et al. Persistent mild hypothyroidism associated with novel sequence variants of the DUOX2 gene in two siblings[J]. *Hum Mutat*, 2005, 26(4): 395.
- [11] Vaisman M, Rosenthal D, Carvalho DP. Enzymes involved in thyroid iodide organification[J]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2004, 48(1): 9-15.
- [12] Moreno JC, Bikker H, Kempers MJ, et al. Inactivating mutations in the gene for thyroid oxidase 2 (THOX2) and congenital hypothyroidism[J]. *N Engl J Med*, 2002, 347(2): 95-102.
- [13] Varela V, Rivolta CM, Esperante SA, et al. Three mutations (p.Q36H, p.G418fsX482, and g.IVS19-2A>C) in the dual oxidase 2 gene responsible for congenital goiter and iodide organification defect[J]. *Clin Chem*, 2006, 52(2): 182-191.
- [14] Pfarr N, Korsch E, Kaspers S, et al. Congenital hypothyroidism caused by new mutations in the thyroid oxidase 2 (THOX2) gene[J]. *Clin Endocrinol*, 2006, 65(6): 810-815.
- [15] Chiesa A, Rivolta CM, Targovnik HM, et al. Clinical, biochemical, and molecular findings in Argentinean patients with goitrous congenital hypothyroidism[J]. *Endocrine*, 2010, 38(3): 377-385.
- [16] Maruo Y, Takahashi H, Soeda I, et al. Transient congenital hypothyroidism caused by biallelic mutations of the dual oxidase 2 gene in Japanese patients detected by a neonatal screening program[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93(11): 4261-4267.
- [17] 卢德国, 车峰远, 贾秋桦, 等. DUOX2 基因突变引起先天性甲状腺功能减低伴甲状腺肿大的研究 [J]. *中国优生与遗传杂志*, 2012, 20(9): 15-17.

(本文编辑: 邓芳明)