

先天性甲状腺功能减低症的 Pax8 基因研究

黄晓东 ,顾学范 ,沈永年 ,张雅芬 ,叶军 ,陈瑞冠

(上海儿科医学研究所/上海第二医科大学附属新华医院 ,上海 200092)

[摘 要] 目的 探讨 Pax8 基因在先天性甲状腺功能减低症(甲低)病因学中的地位。方法 对 50 例经内分泌专科门诊或新生儿筛查检出确诊的先天性甲状腺功能减低症患者,从外周血白细胞中提取基因组 DNA,采用 PCR-SSCP-DNA 测序方法进行 Pax8 基因外显子 2~9 分析。结果 Pax8 基因外显子 2~9 编码区未发现突变。结论 Pax8 基因编码区的结构改变,在中国人甲低的病因学中可能不具有重要地位。  
[关 键 词] 甲状腺功能减低症;先天性;Pax8 基因;单链构象多态性分析  
[中图分类号] R582+.2 [文献标识码] A [文章编号] 1008-8830(2002)04-0279-02

Pax8 Gene in Congenital Hypothyroidism

HUANG Xiao-Dong ,GU Xue-Fan ,SHEN Yong-Nian , et al.

Shanghai Institute for Pediatric Research , Shanghai Xinhua Hospital , Shanghai 200092 , China

**Abstract :** **Objective** To investigate the role of Pax8 in the pathogenesis of congenital hypothyroidism. **Methods** Genomic DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes and PCR-SSCP-Direct DNA sequencing was applied to study exon 2~exon 9 of Pax8 gene in fifty patients who had been detected by neonatal screening or endocrinologists and diagnosed as having congenital hypothyroidism. **Results** No mutation was demonstrated in the encoding regions of Pax8 gene. **Conclusions** Structural changes in Pax8 gene may not play an important role in pathogenesis of primary congenital hypothyroidism.  
**Key words :** Hypothyroidism ; Congenital ; Pax8 gene ; SSCP

先天性甲状腺功能减低症是儿童内分泌疾病中最常见的一种,发病率为 1/3 000~1/4 000<sup>[1]</sup>,如果不得能得及时和适当的治疗,患者将发生严重的智能落后和生长障碍。目前对于大部分病例的发病机制还不清楚,90 年代中期以来,国外一些研究证明其发病与一些基因的突变有关。在综合国外研究成果的基础上,我们选择了在该症患者中进行 Pax8 基因的研究。

1 材料与方法

1.1 对象

50 例研究对象为上海新华医院儿科内分泌专科门诊或上海儿科医学研究所新生儿筛查检出并经实验室检测确诊的先天性甲状腺功能减低症的患者,男性 18 例,女性 32 例,均治疗随访两年以上。

对象分布于华东地区,有兄妹和姐妹同患此病的两个家系病例,所有对象无甲状腺肿大,经 B 超或<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub> 扫描或 ECT 检查发现甲状腺缺如、异位、发育不良共 40 例。除有两位分别合并房缺和动脉导管未闭外,余无其他先天畸形的情况。

1.2 Pax8 基因外显子的扩增

经监护人知情同意,取患者外周静脉血 2 ml,分离白细胞并提取基因组 DNA。采用源于 Pax8 基因内含子序列的引物<sup>[2]</sup>,进行 Pax8 基因外显子 2~9 的 PCR 扩增。

50 μl PCR 反应缓冲液中含 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 1.0% Triton X-100, 1.5 mM Mg-Cl<sub>2</sub> 引物各 0.5 μM(上海生工生物工程公司), 125 μM dNTPs, 2U Taq DNA 聚合酶(华美生物工程公司)以及 100 ng 基因组 DNA。采用 GeneAmp PCR System 2400 扩增仪(PERKIN ELMER),各引物对

[收稿日期] 2001-12-30; [修回日期] 2002-04-24  
[基金项目] 上海高校科学技术发展基金(99B15)  
[作者简介] 黄晓东(1964-),女,博士,副主任医师。

Tm 如下 ,exon 2:51℃ ,exon 3:52℃ ,exon 4:57℃ , exon 5:55℃ ,exon 6:53.5℃ ;exon 7:61℃ ,exon 8: 65℃ ,exon 9:60.2℃。

### 1.3 Pax8 基因外显子的 SSCP 分析

Pax8 基因外显子 2~9 的 PCR 产物以含 95% 去离子甲酰胺缓冲液稀释 ,96℃ 变性 5 min 后置冰浴 ,上样于 6% 或 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶 ,分别于 4℃ 和 17℃ ,垂直电泳( Bio-RAD )5~6 h。采用银染方法观察电泳条带并置干胶仪( Bio-RAD )抽干 2 h ,长期保存。

### 1.4 Pax8 基因外显子的 DNA 顺序

将 PCR 产物纯化( QIAGEN )后 ,采用 BigDye Terminator Ready Reaction 试剂盒( PERKIN ELMER ) ,ABI PRISM™ 337 DNA 顺序仪进行了 Pax8 基因外显子 2~9 的 DNA 直接测序。测序引物除外显子 2 和 3 外 ,均与 PCR 引物同。外显子 2 和 3 的测序引物分别是 :2F 5'-ACCCAACTCC-TACCTG-3' ;2R 5'-CGTGCTTACCTGCCAG-3' ; 3F 5'-TTGGGATTCTCTATT-3' ;3R 5'-TCCT-GATTTCCTCCAAAG-3'。

## 2 结果

全部研究对象的 Pax8 基因外显子 2~9 的 PCR-SSCP 分析结果未发现特异的、与健康对照者不同的电泳条带图形。选择性地对其中甲状腺形态发育异常的 40 位研究对象 ,进行 Pax8 基因外显子 2~9 编码区 DNA 测序 ,结果显示外显子 3~9 编码区的 DNA 序列与 GeneBank( NM-003466 )的序列一致 ,而外显子 2( 包括两位健康对照者 )第 143 位碱基( Pax8cDNA 第 178 位 )存在 T→C 的改变 ,但所编码的氨基酸并不发生变化 ,均为甘氨酸。

## 3 讨论

在先天性甲状腺功能减低症患者中 ,80%~85% 存在甲状腺胚胎发育异常<sup>[1]</sup> ,因此研究调控甲状腺胚胎发育的相关基因成为探索其病因学的一个重要切入点并具有更广泛的意义。

90 年代中期通过体外细胞培养和基因剔除方法在动物实验中证实 ,3 个特异的甲状腺转录因子即甲状腺转录因子 I( TTF- I )、甲状腺转录因子 II( TTF- II )和 Pax8 参与调控甲状腺原基的形成、移

行、分化和增殖的过程<sup>[3]</sup> ,但至今未在患者中找到 TTF- I 基因突变<sup>[4,5]</sup> ,唯一找到 TTF- II 基因突变的两个同胞患者均合并腭裂、鼻后孔闭锁等先天畸形<sup>[6]</sup>。Pax8 属于哺乳类 Pax 蛋白家族的转录因子 ,具有保守的配对域( paired domain )结构 ,能识别特异的 DNA 序列并与之结合 ,调控靶基因的转录<sup>[7]</sup>。1998 年 Macchia<sup>[2]</sup>报道了在 5 个意大利患者中找到 3 种 Pax8 基因突变 ,突变均发生在 Pax8 基因的配对域中 ,而且发生 Pax8 基因突变的患者均有甲状腺发育异常。

本实验对来自中国华东地区的 50 例患者所进行的 Pax8 基因外显子 2~9 的检测 ,在包括配对域在内的编码区中未发现突变 ,说明 Pax8 基因的结构改变 ,即使在甲状腺发育异常的病人中也很少见 ,可能不是中国人先天性甲低的一个常见致病原因。

在本研究中发现全体研究对象的 Pax8 基因外显子 2 第 143 位存在 T→C 置换 ,可能显示了先天性甲低病因的种族差异性。

综合我们及国外已有的研究结果表明 ,占先天性甲状腺功能减低症中绝大部分的甲状腺发育异常病例的病因的分子基础有待阐明 ,应继续探索新的相关基因和/或环境影响因素。

### [参 考 文 献]

- [1] Klett M. Epidemiology of congenital hypothyroidism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* [J]. 1997 , 105( Suppl 4 ): 19-23.
- [2] Macchia PE , Lapi P , Krude H , et al. PAX8 mutations associated with congenital hypothyroidism caused by thyroid dysgenesis [J]. *Nat Genet* , 1998 , 19( 1 ): 83-86.
- [3] Macchia PE. Recent advances in understanding the molecular basis of primary congenital hypothyroidism [J]. *Molecular Medicine today* , 2000 , 6( 1 ): 36-42.
- [4] Lapi P , Macchia PE , Chiovato L , et al. Mutations in the gene for thyroid transcription factor- I ( TTF- I ) are not a frequent cause of congenital hypothyroidism( CH ) with thyroid dysgenesis [J]. *Thyroid* , 1997 , 7( 3 ): 383-387.
- [5] Perna MG , Civitarella D , De Filippis V , et al. Absence of mutations in TTF- I gene in patients with thyroid dysgenesis [J]. *Thyroid* , 1997 , 7( 3 ): 377-381.
- [6] Clifton-Bligh RJ , Wentworth JM , Heinz P , et al. Mutation of the gene encoding human TTF-2 associated with thyroid agenesis , cleft palate atresia [J]. *Nat Genet* , 1998 , 19( 4 ): 399-401.
- [7] Strachan T , Read AP. PAX genes. *Current Opinion in Genetics and Development* [J]. 1994 , 4( 3 ): 427-438.

( 本文编辑 俞燕 )