

论著·临床研究

先天性类脂质性肾上腺皮质增生症临床特点及 StAR 基因突变分析

谢婷 郑纪鹏 黄永兰 樊春 吴冬燕 谭敏沂 李秀珍 程静 刘丽

(广州医科大学附属广州市妇女儿童医疗中心遗传与内分泌科, 广州 510623)

[摘要] 该文回顾性分析2例先天性类脂质性肾上腺皮质增生症(LCAH)患儿的临床表现、类固醇激素谱及影像学检查结果,采用DNA直接测序法及限制性片段长度多态性(RFLP)技术对类固醇生成急性调节蛋白(StAR)基因突变进行分析。2例患儿均为46,XX女性,确诊年龄分别为4个月及2岁4个月。婴儿早期出现皮肤色素沉着、生长迟缓、低钠血症等肾上腺皮质功能低下表现,血ACTH显著增高,皮质醇正常或降低,各类雄性激素均未见增高。肾上腺超声提示双侧肾上腺增大或正常,经氢化可的松及9 α -氟氢可的松替代治疗后生长发育正常。StAR基因突变分析显示患儿1为p.Q258X纯合已知无义突变;患儿2为p.E123K/IVS4+2T>A复合杂合突变,且为新突变,其父母分别为新突变IVS4+2T>A及p.E123K的携带者。保守性分析及PolyPhen-2软件预测提示p.E123K为致病性突变。RFLP分析显示患儿2及其父亲的PCR扩增产物经酶切后同时出现670、423、247 bp 3条条带,而其母亲及50例正常对照仅出现423和247 bp 两条条带,提示IVS4+2T>A突变改变氨基酸酶切位点。对于婴儿早期发生的肾上腺皮质功能低下的女性表型患儿应警惕LCAH,类固醇激素谱、核型分析及肾上腺超声有助诊断,确诊依赖StAR基因突变分析。 [中国当代儿科杂志, 2015, 17(5): 472-476]

[关键词] 先天性类脂质性肾上腺皮质增生症; StAR 基因; 突变

Clinical features and StAR gene mutations in children with congenital lipid adrenal hyperplasia

XIE Ting, ZHENG Ji-Peng, HUANG Yong-Lan, FAN Chun, WU Dong-Yan, TAN Min-Yi, LI Xiu-Zhen, CHENG Jing, LIU Li. Department of Genetics and Endocrinology, Guangzhou Women and Children's Medical Center, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510623, China (Huang Y-L, Email: xxhuang321@163.com)

Abstract: This article reported the clinical manifestations, steroid profiles and adrenal ultrasound findings in two unrelated Chinese girls with lipid congenital adrenal hyperplasia (LCAH). Direct DNA sequencing and restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis were used to identify the mutations of steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. The two patients with 46,XX karyotype, presented hyperpigmentation, growth retardation, and hyponatremia. Steroid profiles analysis revealed elevated plasma adrenocorticotrophic hormone levels, decreased or normal serum cortisol levels and low levels of androgens. Ultrasound examinations revealed that enlarged adrenals in patient 1 and normal adrenals in patient 2. Direct DNA sequencing of StAR gene showed a reported homozygous for c.772C>T(p.Q258X) in patient 1. Compound heterozygous for c.367G>A(p.E123K) and IVS4+2T>A (both novel mutations) were found in patient 2, inherited from her mother and father respectively. The amino acid of mutant position of the novel p.E123K was highly conserved in ten different species and was predicted to have impacts on the structure and function of StAR protein by the PolyPhen-2 prediction software. RFLP analysis revealed three bands (670, 423 and 247 bp) in patient 2 and her father and two bands (423 and 247 bp) in her mother and 50 controls. It is concluded that LCAH should be considered in girls with early onset of adrenal insufficiency and that steroid profiles, karyotype analysis, adrenal ultrasound and StAR gene analysis may be helpful for the definite diagnosis of LCAH.

[Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(5): 472-476]

Key words: Congenital lipid adrenal hyperplasia; StAR gene; Mutation

[收稿日期] 2014-10-27; [接受日期] 2014-12-23

[基金项目] 广州市科技支撑项目(2010J-E231-1); 广东省科技厅项目(2011B061300086)。

[作者简介] 谢婷,女,硕士研究生。

[通信作者] 黄永兰,女,主任医师。

先天性类脂质性肾上腺皮质增生症 (lipoid congenital adrenal hyperplasia, LCAH) 是先天性肾上腺皮质增生症中最罕见和最严重的类型, 由于类固醇生成急性调节蛋白 (steroidogenic acute regulatory protein, StAR) 基因突变导致肾上腺及性腺类固醇激素生成障碍, 临床上表现为肾上腺皮质功能低下及性激素合成障碍, 皮质激素替代治疗可获得良好预后。本病呈常染色体隐性遗传, 上海新华医院曾报道 1 例^[1]。本文对 2 例经 StAR 基因分析确诊为 LCAH 的女性外表患儿的临床特点及 StAR 基因突变结果进行分析, 旨在提高儿科医生对本病的认识, 以便早期诊断及早期干预。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2013 年 4 月于广州市妇女儿童医疗中心遗传与内分泌科就诊的 2 例女性表型“原发性肾上腺皮质功能减低症”患儿为研究对象, 经 StAR 基因突变分析确诊为 LCAH。该 2 例患儿分别来自无血缘家庭, 例 1 患儿父母为 3 代内近亲结婚。另随机选取 50 例健康儿童外周血 DNA 为对照。本研究获得患儿家长知情同意。

1.2 DNA 提取

采集患儿及其父母外周静脉血 2 mL, 采用美国 Innovogen 公司生产的 Blood gDNA Magentic Beads Purification Kit 提取基因组 DNA。

1.3 StAR 基因突变分析

参照 NCBI 数据库中 StAR 基因序列及相关文献^[1-4], 合成 5 对引物 (表 1), 扩增 StAR 基因 7 个外显子及其两侧侧翼序列。PCR 反应体系为 25 μ L: 含 10 $\times$ Taq 缓冲液 2.5 μ L, dNTPs (2.5 mM) 2.0 μ L, BTA (5 M) 2.5 μ L, Taq 聚合酶 (5 U/L) 0.15 μ L, DNA 模板 (20~30 ng) 2.0 μ L, 上、下游引物 (5 mmol/L) 各 0.5 μ L, 加去离子水至 25 μ L。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 57~65 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 7 min。PCR 产物纯化后用 ABI3730 测序仪系统 (ABI 公司) 完成测序, 测序结果应用 DNAMAN 软件与标准序列进行比对分析。对于检出的突变, 于人类基因突变数据库 (HGMD) 及千人基因组数据库 (1000 Genomes) 检索是否

为已报道突变和多态性。

1.4 新错义突变致病性分析

对新错义突变进行 10 种不同物种间保守性分析; 并采用 PolyPhen-2 软件对新错义突变进行蛋白功能预测, 评分越接近 1, 突变致病性可能性越大。

1.5 限制性片段长度多态性分析

对新剪接突变 IVS4+2T>A 进行限制性片段长度多态性 (RFLP) 分析, 取外显子 4~5 的 PCR 产物 10 μ L, 加入限制性内切酶 HphI 10 U 及酶切缓冲液至总体积 20 μ L, 37 $^{\circ}$ C 水浴过夜, 酶切产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳 30 min, 并行对照分析, 进一步排除单核苷酸多态性的可能性。

表 1 StAR 基因 PCR 引物及扩增片段长度

外显子	引物 (5' $\rightarrow$ 3')	产物长 (bp)	退火温度 ($^{\circ}$ C)
1	F: TAACACAGCTTTCTGAGCCTCAAT R: ATCAGAAATTGGGTGGCCTGAGCCTC	619	64
2~3	F: CTAGTTCAGGTCCCTGCTAGAATCC R: ACTCTCCAGGCTGTCTTTTATGGGG	908	62
4~5	F: TGCTGGGATTATAGGCGTGAAC R: GGGTTGGTTTCTTGGAGCTG	670	65
6	F: GTACCGTAGAAACGTGTTATC R: GCCTGTGATTCTATCAGAATAG	305	57
7	F: CCTGGCAGCCTGTTTGTGATAG R: ATGAGCGTGTGTACCACTGCAG	253	62

2 结果

2.1 临床表现

2 例患儿确诊年龄分别为生后 4 个月及 2 岁 4 个月, 长期给予氢化可的松及 9 α -氟氢可的松替代治疗, 专科门诊随访 1 年 6 个月。2 例患儿初诊时具有如下临床特征: (1) 婴儿早期出现不同程度的肾上腺皮质功能减退表现, 如生长迟缓、皮肤色素沉着、电解质紊乱, 促肾上腺皮质激素 (ACTH) 显著增高, 皮质醇正常或降低; (2) 不伴有各类雄性激素增高; (3) 女性外表, 染色体核型 46, XX; (4) 肾上腺超声提示双侧肾上腺增大或正常 (表 2)。2 例患儿出院诊断均为原发性肾上腺皮质功能减低症, 经生理剂量糖皮质激素及盐皮质激素替代治疗, 随访 1 年余, 生长发育正常, 肾上腺大小无明显变化。

表 2 两例 LCAH 患儿初诊时临床表现

项目	病例 1	病例 2	正常值
起病年龄	16 d	3 个月	
初诊年龄	21 d	1 岁 4 个月	
主要症状体征	皮肤黝黑	呕吐、皮肤黝黑	
体重 (kg)	2.26(-4.47 SDS)	9.2(-0.87 SDS)	
身高 (cm)	45(-5.05 SDS)	77.5(-0.62 SDS)	
血钠 (mmol/L)	109	121	134~144
血钾 (mmol/L)	6.9	4.1	3.5~5.7
ACTH(pmol/L)	>275	>275	0~10.12
皮质醇 (nmol/L)	226	91.6	138~772.8
睾酮 (nmol/L)	<0.69	<0.69	<0.7
硫酸脱氢表雄酮 (μmol/L)	<0.41	<0.41	0.95~11.67
雄烯二酮 (nmol/L)	<1.05	<1.05	1.0~11.5
17- 羟孕酮 (ng/mL)	0.26	0.26	<2.5
染色体核型	46, XX	46, XX	
肾上腺超声	右 15 mm × 7 mm; 左 14 mm × 8 mm	大小正常	正常新生儿: 长径 <20 mm, 横径 <4 mm

注: ACTH 为促肾上腺皮质激素; 括号内为与同年龄同性别健康儿童体格发育测量值比较的差异; SDS (Z 分值) = (测量值 - 平均数) / 标准差 (SD)。

2.2 StAR 基因分析

病例 1 为外显子 7 的 p.Q258X 纯合无义突变 (图 1A), 其父母均为该突变携带者 (图 1B~C), 该突变为已知致病突变; 病例 2 为 p.E123K/IVS4+2T>A 复合杂合突变 (图 2A~B), 母亲为外

显子 4 的 p.E123K 携带者 (图 2C), 父亲为内含子 4 的 IVS4+2T>A 携带者 (图 2D), 突变 p.E123K 及 IVS4+2T>A 在 HGMD 及 1000 Genomes 数据库中均未见报道, 为新突变。

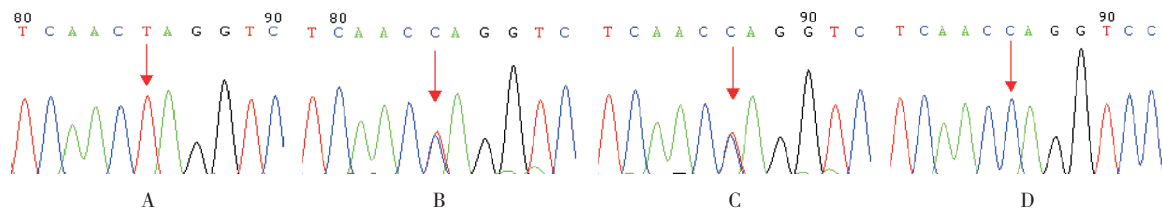


图 1 StAR 基因外显子 7 的 p.Q258X 纯合无义突变测序图 A: 病例 1 外显子 7 的 p.Q258X 纯合无义突变; B~C: 病例 1 父母均为该位点杂合突变; D: 正常对照。箭头所指为突变位点。

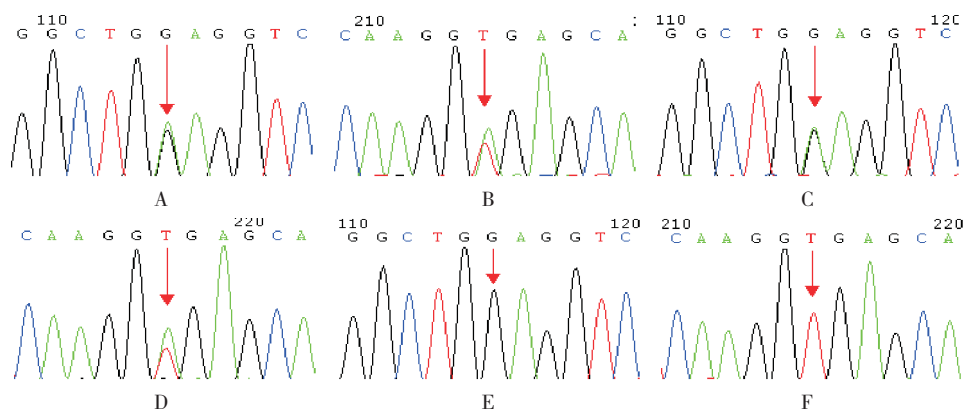


图 2 StAR 基因 p.E123K/IVS4+2T>A 复合杂合新突变测序图 A~B: 病例 2 p.E123K/IVS4+2T>A 复合杂合新突变; C: 病例 2 母亲外显子 4 的 p.E123K 杂合新错义突变; D: 病例 2 父亲内含子 4 的 IVS4+2T>A 杂合新剪接突变; E~F: 正常对照。箭头所指为突变位点。

2.3 新错义突变致病性分析

对新错义突变 p.E123K 进行 10 种不同物种相应位点保守性分析,提示该位点在多个物种间高度保守(图 3);同时用 PolyPhen-2 软件进行蛋白功能预测,评分为 0.99,提示该位点氨基酸突变影响蛋白质功能,致病突变可能性大。

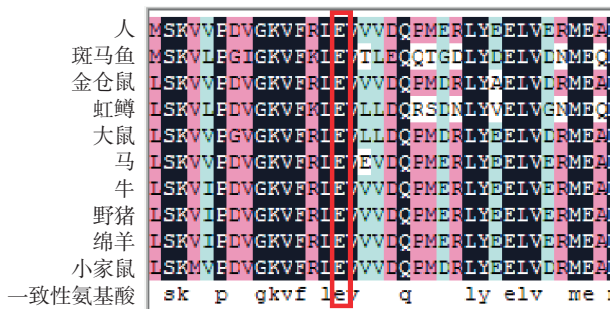


图 3 StAR 基因 123 号氨基酸 E 保守性分析 氨基酸 E 为谷氨酸,红色方框内所示。

2.4 RFLP 分析

对新剪接位点突变 IVS4+2T>A 进行 RFLP 分析显示,酶切前病例 2、其父母及正常人结果中仅出现 670 bp 条带,经 HphI 酶切后,病例 2 及其父亲结果中同时出现 670、423、247 bp 3 条条带,而其母亲及正常人结果中均仅出现 423 bp 和 247 bp 2 条条带,见图 4。

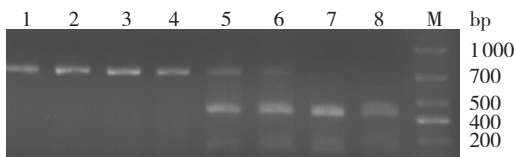


图 4 RFLP 分析电泳图 M: Marker; 1~4: 病例 2、病例 2 父、母及正常人标本未经酶切时的 PCR 扩增产物,仅出现 670 bp 条带; 5~6: 病例 2 及其父亲标本经酶切后的 PCR 扩增产物,同时出现 670、423、247 bp 3 条条带; 7~8: 病例 2 母亲及正常人标本经酶切后的 PCR 扩增产物,同时出现 423 bp 及 247 bp 2 条条带。

3 讨论

StAR 的功能是将胆固醇从胞浆内转运至线粒体内膜,在 P450_{sc} 酶的作用下将胆固醇转化为孕烯醇酮,是合成类固醇激素的起始和限速步骤。StAR 基因突变导致 StAR 蛋白酶活性下降,影响肾上腺及性腺类固醇激素合成,表现为不同程度的肾上腺皮质功能低下及男性性发育异常。根据

肾上腺皮质功能不全发病年龄及性腺发育情况,临床上分为经典型 LCAH 及非经典型 LCAH。经典型患儿常于婴儿早期出现失盐型肾上腺皮质功能低下表现,男性胎儿因雄激素合成障碍表现为不同程度的男性化不全或完全女性外表,女性胎儿性分化正常。非经典型患儿常于 2~4 岁发病,男性出生时外生殖器正常或出现隐睾、尿道下裂等,青春期可伴有睾丸功能低下,生精异常等^[5-7]。StAR 基因定位于 8p11.2,全长 8.38 kb,包含 7 个外显子。至 2014 年 2 月 HGMD 数据库已报道 StAR 基因突变 63 种。多为错义、无义及移码突变,剪接位点突变占 10%,尚有 1 例 StAR 基因完全缺失的报导^[8]。极少数 LCAH 是由于 CYP11A1 基因突变导致 P450_{sc} 酶活性降低所致^[9]。

本文 2 例患儿均在婴儿期出现失盐、皮肤色素沉着等肾上腺皮质功能低下表现,无男性化等雄激素增高表现,肾上腺超声排除出血、感染及肿瘤等继发性损伤,亦未提示肾上腺发育不良。染色体核型分析证实为女性,临床高度疑似 StAR 基因突变所致的 LCAH,尤其是例 1 患儿肾上腺超声提示双侧肾上腺肿大。病例 1 StAR 基因分析结果为 p.Q258X 纯合已知致病突变,从分子水平确诊为 LCAH。p.Q258X 为日本、韩国 LCAH 患者 StAR 基因最常见的突变类型^[4]。p.Q258X 基因型的临床表型特点是生后 2 个月内即出现严重的肾上腺皮质功能减退症状。

病例 2 临床表现相对较轻,生后 2 个月体检曾发现轻微低钠血症,未引起重视,体格发育基本正常。1 岁时因感染诱发逐渐出现皮肤色素沉着、呕吐等肾上腺皮质功能低下表现,确诊后经氢化可的松替代治疗,皮肤色素正常。其 StAR 基因分析发现 p.E123K/IVS4+2T>A 复合杂合突变,均为新突变,分别来自于患儿的母亲、父亲。错义突变 p.E123K 是由于突变 c.367G>A 导致第 123 号碱性的谷氨酸变为酸性的赖氨酸,经物种保守分析及“PolyPhen-2”软件蛋白功能预测,结果均高度提示该突变为致病性突变。剪接突变 IVS4+2T>A 经 RFLP 分析排除单核苷酸多态性可能。结合文献资料,推测该突变可能的异常剪接方式为:(1)外显子 4 跳跃(丢失 53 个氨基酸);(2)丢失部分外显子序列或残留部分内含子序列;(3)内含子 4 残留,导致 mRNA 转录本插入 141 个核苷酸,移码突变破坏了蛋白的活性而致病;(4)上述所有

转录本均存在的嵌合体型^[10]。2014年Camats等^[8]进行了13例剪接位点突变分析,结果提示IVS3至IVS6剪接位点突变均导致了严重的临床表型,发病年龄从生后1d至生后1年,其中46%于生后7~10d出现临床症状。因此,我们推测该剪接突变为致病性突变。

LCAH临床表现缺乏特异性,容易误诊为原发性肾上腺皮质功能减退症或Addison氏病,主要依赖StAR基因分析明确诊断。对于婴儿早期出现的肾上腺皮质功能低下伴/或不伴性发育异常,应注意与下列疾病相鉴别:(1)各种类型的先天性肾上腺皮质增生症,尤其是罕见的3 β -羟类固醇脱氢酶缺乏症。(2)先天性肾上腺发育不良,男性患儿首先考虑为DAX-1基因突变所致的X-连锁肾上腺发育不良,而女性患者应注意与极其罕见的SF-1基因突变所致肾上腺发育不良鉴别,染色体核型及肾上腺超声检查有助鉴别^[11]。本组病例均为46,XX女性,肾上腺超声提示双侧肾上腺增大或正常,不支持先天性肾上腺发育不良,亦可排除出血、肿瘤、感染等继发性肾上腺病变。

LCAH患者通常因胆固醇及胆固醇酯在肾上腺组织细胞胞浆聚集,导致类脂质性肾上腺增大,但尚有部分LCAH患者肾上腺超声正常^[12]。本组例1患儿生后24d超声提示双侧肾上腺增大,经规范的激素替代治疗,多次超声复查提示双侧肾上腺体积较前稍缩小,其原因可能与早期诊断,早期替代治疗,避免了肾上腺在ACTH长期刺激下加重胆固醇等类脂质物质聚集有关。例2多次检查肾上腺超声未提示明显异常,可能与该患儿病情稍轻,诊断及治疗及时有关。

综上所述,LCAH是一种罕见的失盐型先天性肾上腺皮质增生症,同时伴有肾上腺及性腺类固醇激素合成障碍。对女性表型的肾上腺皮质功能低下者,应警惕StAR基因突变所致LCAH,常规进行染色体核型分析及肾上腺超声检测有助鉴别,StAR基因突变分析可明确诊断。新突变p.E123K及IVS4+2T>A为致病性突变。对于基因诊断明确的高危家庭,可进行遗传咨询及产前诊断,预防疾病再发风险。

[参考文献]

- [1] 邱文娟,叶军,韩蓓,等.先天性类脂质性肾上腺增生症分子遗传学分析[J].中华儿科杂志,2004,42(8):585-588.
- [2] Eiden-Plach A, Nguyen HH, Schneider U, et al. Alu Sx repeat-induced homozygous deletion of the StAR gene causes lipoidcongenital adrenal hyperplasia[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2012, 130(1-2): 1-6.
- [3] Gonzalez AA, Reyes ML, Carvajal CA, et al. Congenital lipoid adrenal hyperplasia caused by a novel splicing mutation in the gene for the steroidogenic acute regulatory protein[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2004, 89(2): 946-951.
- [4] Chen X, Baker BY, Abduljabbar MA, et al. A genetic isolate of congenital lipoid adrenal hyperplasia with atypical clinical findings[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90(2): 835-840.
- [5] Baker BY, Lin L, Kim CJ, et al. Nonclassic congenital lipoid adrenal hyperplasia: a new disorder of the steroidogenic acute regulatory protein with very late presentation and normal male genitalia[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2006, 91(12): 4781-4785.
- [6] Sahakitrungruang T, Soccio RE, Lang-Muritano M, et al. Clinical, genetic, and functional characterization of four patients carrying partial loss-of-function mutations in the steroidogenic acute regulatory protein (StAR)[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2010, 95(7): 3352-3359.
- [7] Fluck CE, Pandey AV, Dick B, et al. Characterization of novel StAR (steroidogenic acute regulatory protein) mutations causing non-classic lipoid adrenal hyperplasia[J]. PLoS One, 2011, 6(5): e20178.
- [8] Camats N, Pandey AV, Fernandez-Cancio M, et al. STAR splicing mutations cause the severe phenotype of lipoidcongenital adrenal hyperplasia: insights from a novel splicing mutation and review of reported cases[J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2014, 80(2): 191-199.
- [9] King SR, Bhargoo A, Stocco DM. Functional and physiological consequences of StAR deficiency: role in lipoid congenital adrenal hyperplasia[J]. Endocr Dev, 2011, 20: 47-53.
- [10] Lekarev O, Mallet D, Yuen T, et al. Congenital lipoid adrenal hyperplasia (a rare form of adrenal insufficiency and ambiguous genitalia) caused by a novel mutation of the steroidogenic acute regulatory protein gene[J]. Eur J Pediatr, 2012, 171(5): 787-793.
- [11] 肖园,杨军,张惠杰,等.先天性肾上腺发育不良家系中DAX-1新突变的发现[J].中华儿科杂志,2007,45(12):937-941.
- [12] Hashemipour M, Ghasemi M, Hovsepian S. A case of congenital lipoid adrenal hyperplasia[J]. Int J Prev Med, 2012, 3(7): 510-514.

(本文编辑: 万静)