

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2017.11.007

论著 · 临床研究

LHCGR 基因突变 (Asp578His) 致家族性男性性早熟 1 例临床特点及基因分析

王敏 李敏 刘悦笙 雷思敏 肖延凤

(西安交通大学第二附属医院儿科, 陕西 西安 710061)

[摘要] 该文报道 1 例由 LHCGR 基因激活性杂合突变导致的家族性男性性早熟 (FMPP) 患儿的临床特点及基因分析。患儿为男性, 婴儿时期出现了外生殖器增长过快、生长加速, 伴阴毛及阴茎勃起, 结合患儿性征检查、促性腺激素释放激素兴奋试验、血清睾酮检测及骨龄检查等结果, 临床诊断为外周性性早熟。随后对患儿及其父母的性早熟相关基因进行检测。基因测序结果提示患儿黄体生成素/绒毛膜促性腺激素受体 (LHCGR) 基因第 11 外显子 1732G>C 突变, 导致 578 位氨基酸由天冬氨酸变为组氨酸, 该突变是 1 个未见文献报道的新突变, 且父母基因检测结果未见异常。联用第 3 代芳香化酶抑制剂来曲唑和抗雄激素制剂螺内酯治疗半年后, 患儿症状得到控制。该研究结果扩展了 LHCGR 基因突变谱, 为 FMPP 病因诊断及家系的遗传咨询和产前诊断提供了分子依据。

[中国当代儿科杂志, 2017, 19(11): 1159-1164]

[关键词] 家族性男性性早熟; LHCGR 基因; 激活性突变; 婴儿

Familial male-limited precocious puberty due to Asp578His mutations in the LHCGR gene: clinical characteristics and gene analysis in an infant

WANG Min, LI Min, LIU Yue-Sheng, LEI Si-Min, XIAO Yan-Feng. Department of Pediatrics, The Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China (Xiao Y-F, Email: xiaoyanfeng0639@sina.com)

Abstract: The aim of the study was to provide a descriptive analysis of familial male-limited precocious puberty (FMPP), which is a rare inherited disease caused by heterozygous constitutively activating mutations of the luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor gene (LHCGR). The patient was a ten-month-old boy, presenting with penile enlargement, pubic hair formation, and spontaneous erections. Based on the clinical manifestations and laboratory data, including sexual characteristics, serum testosterone levels, GnRH stimulation test, and bone age, this boy was diagnosed with peripheral precocious puberty. Subsequently the precocious puberty-related genes were analyzed by direct DNA sequencing of amplified PCR products from the patient and his parents. Genetic analysis revealed a novel heterozygous missense mutation c.1732G>C (Asp578His) of the LHCGR gene exon11 in the patient, which had never been reported. His parents had no mutations. After combined treatment with aromatase inhibitor letrozole and anti-androgen spironolactone for six months, the patient's symptoms were controlled. The findings in this study expand the mutation spectrum of the LHCGR gene, and provide molecular evidence for the etiologic diagnosis as well as for the genetic counseling and prenatal diagnosis in the family.

[Chin J Contemp Pediatr, 2017, 19(11): 1159-1164]

Key words: Familial male-limited precocious puberty; LHCGR gene; Activating mutation; Infant

家族性男性性早熟 (familial male-limited precocious puberty, FMPP) 又称家族性高睾酮血症, 在 1981 年由 Schedewie 等^[1]首次报道, 属于常染色体控制的非促性腺激素依耐性的性限制性遗传

病, 是外周性性早熟的一种罕见疾病。1993 年 Shenker 等^[2]首次从 8 个家族的多名 FMPP 患者中检测到 LHCGR 基因突变 (D578G), 提示该疾病可能是由编码黄体生成激素/绒毛膜促性腺激素受

[收稿日期] 2017-08-02; [接受日期] 2017-10-09

[作者简介] 王敏, 女, 博士研究生。

[通信作者] 肖延凤, 女, 主任医师。

体(LHCGR)基因突变导致的。后续的功能试验表明,表达该突变的COS-7细胞在无激动剂存在的情况下,腺苷酸环化酶(cAMP)的合成显著增加,提示该病患者睾丸Leydig细胞的自发活性来源于LH受体的自发性持续性激活^[2],导致FMPP的发生。目前已知引起FMPP的LHCGR突变类型共18种,2016年5月我院收治了1名FMPP患者,本文旨在汇报该患儿的临床特点和分子诊断结果,为本病诊治研究提供参考,具体信息如下:

1 资料与方法

1.1 研究对象

患儿,男,10个月9d,因发现阴茎增长过快4个月来我院就诊。患儿近4个月出现阴茎增长过快,伴每日阴茎勃起数次,并出现阴毛,生长速度较同龄儿明显偏快。无变声,无痤疮,无体味、体毛增多。患儿系第1胎第1产,足月顺产,出生体重3.1kg,身高51cm。否认特殊接触及药物应用史。母孕期体检未见异常,父亲身高163cm,母亲身高160cm,遗传靶身高168cm(-0.77SD),父母非近亲婚配,家族中其他成员无类似病史。体查:身高80.3cm(+2.42SD),体重12.0kg,性征:乳房Tanner I期,外生殖器发育Tanner分期G2期,阴茎6.0cm×1.9cm,可见阴毛,无腋毛、胡须、痤疮,皮肤无咖啡斑,余体查未见特殊情况。

1.2 辅助检查

血常规、尿常规、肝功能、肾功能、电解质、血脂检查结果均未见异常。甲胎蛋白、癌胚抗原阴性。激素水平检查结果见表1。阴囊B超提示:左侧睾丸大小15mm×6.5mm,右侧睾丸大小15mm×7mm,双侧睾丸体积较同龄儿偏大。肾上腺B超提示:左侧肾上腺厚度4.5mm,右侧肾上腺厚度4.6mm,双侧肾上腺未见包块回声。垂体核磁共振未见异常。左手及腕部正位片提示:骨龄为3岁。

表1 患儿实验室检查结果

激素名称	检测值	参考值范围
LH (mIU/mL)		
0 min	0	
30 min	0.42	-
60 min	0.41	
90 min	0.36	
FSH (mIU/mL)		
0 min	0.06	
30 min	1.61	-
60 min	2.24	
90 min	2.46	
睾酮 (nmol/L)	>35.0	0.7~3.1
孕酮 (ng/mL)	0.30	0.10~0.84
泌乳素 (ng/mL)	25.56	2.64~13.13
皮质醇 (nmol/L)	326	171~536
17-羟孕酮 (ng/mL)	2.50	0.82~16.63
硫酸脱氢表雄酮 (μg/dL)	3.26	3.40~124.00
雄烯二酮 (ng/mL)	<0.30	0.60~3.10
促肾上腺皮质激素 (pg/mL)	32.1	5~50
总甲状腺素 (μg/dL)	5.79	5.0~12.0
游离三碘甲状腺原氨酸 (pmol/L)	3.93	2.0~6.6
生长激素 (ng/mL)	9.08	<20

注:[LH]黄体生成素;[FSH]卵泡刺激素。当LH峰值>5及LH/FSH>0.6,则GnRH激发试验阳性。

1.3 基因检测

在父母知情同意的情况下,采集患儿及其父母外周静脉血各2mL于乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管中。采用QIAamp DNA提取试剂盒(QIAGEN公司)抽提基因组DNA,并测量其吸光度值及浓度。提取的DNA用DNA酶片段化后用磁珠法进行纯化,随后进行PCR扩增并连接上接头序列,经TruSight One Sequencing Panel(美国Illumina公司)两次捕获及纯化,再经PCR扩增和纯化后获得的最终文库在MiSeq测序仪(美国Illumina公司)上对20个性早熟相关的基因进行检测,具体包括:CDKL5、CYP11B1、CYP17A1、CYP19A1、CYP21A2、ESR1、FSHR、GNAS、HSD3B2、IGF1、KDM6A、KISS1、KISS1R、KMT2D、

LHCGR、MKRN3、POR、SHBG、STAR、STK11，对上述基因的外显子编码区进行直接测序，并与参考序列进行比对，从而发现可能存在的基因突变。

1.4 Sanger 测序验证

对可疑候选突变的位点设计 PCR 引物进行扩增及 Sanger 测序验证，并对患儿父母相应位点进行检测。

1.5 LHCGR 变异的保守性分析

不同物种 LHCGR 同源蛋白序列从 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) 数据库下载，应用在线软件 Clustal Omega (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) 比对分析多物种 LHCGR 蛋白的氨基酸序列，以评估被改变氨基酸在进化上的保守性。

1.6 LHCGR 变异的致病性分析

对于所发现的 LHCGR 基因变异，应用在线软件 PolyPhen-2 (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/)、PROVEAN (provean.jcvi.org/index.php) 和 MutationTaster (http://mutationtaster.org/MutationTaster/index.html) 进行预测，分析其致病性。

1.7 突变蛋白结构预测分析

LHCGR 蛋白的结构模型使用在线软件 SWISSMODEL 构建 (http://swissmodel.expasy.org)，并采用 SWISS-PdbViewer 4.1.0 (http://www.Expasy.org/spdbv/) 对突变的蛋白结构进行预测。

2 结果

2.1 临床分析结果

患儿具有典型的临床症状和体征，血清睾酮明显升高，而血清促性腺激素水平仍处于低水平；GnRH 激发实验结果提示该患儿 LH 峰值出现在 30 min，为 0.42 mIU/mL，LH/FSH 最大值为 0.26，GnRH 激发试验阴性，符合外周性性早熟的诊断标准。见表 1。

2.2 遗传学分析结果

通过对患儿外周血 DNA 中的 20 个性早熟相关基因进行检测，发现患儿 LHCGR 基因的 11 号外显子存在杂合突变 c.1732G>C，导致第 578 位密码子编码的氨基酸由天冬氨酸 (Asp) 变为组氨酸 (His)，可能导致编码产物结构改变，使 LHCGR 持续激活。余基因未见明显异常。研究中我们检索了人类基因突变数据库 “The Human Gene Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff” (http://www.hgmd.cf.ac.uk) 以及 PubMed (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/)，证实该突变在之前未被报道过，为一新突变。患儿父亲及母亲均为野生型。结合父母基因检测结果推测先证者 1732 位碱基突变为新发突变。见图 1。

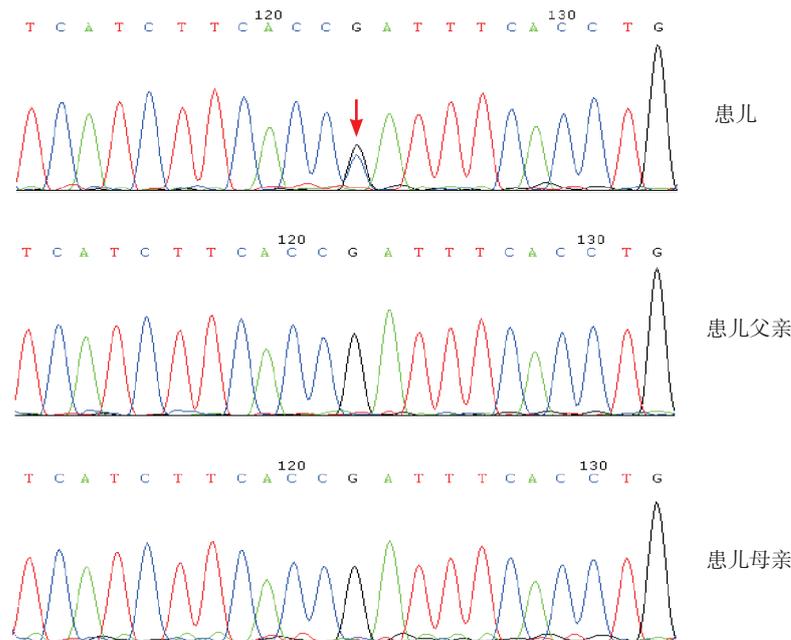


图 1 患儿及其父母基因测序结果 患儿 LHCGR 基因存在 c.1732G>C(p.Asp578His) 突变，其父母基因检测结果未见异常。箭头所示为突变部位。

2.3 突变氨基酸在物种进化上的保守性

将人LHCGR蛋白的氨基酸序列与猪、牛、羊、家鼠、沟鼠、鸡、斑马鱼的蛋白序列进行比对，

结果显示LHCGR蛋白第578位氨基酸在物种进化上完全保守，结果如图2。

	560	D578H	600
NP_000224.2 (Homo sapiens)	---ATNKDTKIAKKMAILIFT	D	FTCMAPISFFAISA AAFKVPLIT--
NP_999614.1 (Pig)	---ATNKDTKIAKKMAVLIIFT	D	FTCMAPISFFAISA AAI.KVPLIT--
NP_776806.1 (Cattle)	---ATNKDTKIAKKMAVLIIFT	D	FTCMAPISFFAISA AAFKVPLIT--
NP_001265495.1 (Sheep)	---ATNKDTKIAKKMAVLIIFT	D	FTCMAPISFFAISA AAFKVPLIT--
NP_037110.1 (Norway rat)	---APNKDTKIAKKMAILIFT	D	FTCMAPISFFAISA AAFKVPLIT--
NP_038610.1 (House mouse)	---APNKDTKIAKKMAILIFT	D	FTCMAPISFFAISA AAFKVPLIT--
NP_990267.1 (Chicken)	---AANKDTKIAKRMAILIFT	D	FTCMAPISFFAISA AAIKVPLIT--
NP_991188.1 (Zebrafish)	---GRAADAKIAKRMAVLIIFT	D	FLCMAPISFFAISA AAFKVPLIT--

图2 多物种LHCGR蛋白氨基酸序列比对分析结果 图中黄色标示突变氨基酸。

2.4 LHCGR新突变致病性分析

LHCGR蛋白p.D578H突变，经Mutation Taster软件预测为致病性突变，预测正确的概率值为0.999。经PROVEAN软件分析，在截点值分数为-2.5的标准下，该突变位点的分数为-5.943，提示为致病性突变。同时，PolyPhen-2软件预测p.D578H为致病性突变，预测正确的概率值为1.0（预测的敏感性为0，特异性为1.0）。以上3种生物信息学分析软件均提示p.D578H突变可能为致病性突变。

2.5 LHCGR蛋白结构预测

进行蛋白结构预测时，用SWISS-MODEL在线检索LHCGR蛋白的模板，未出现相应LHCGR的蛋白模板，因而p.D578野生型选取的蛋白结构模型为人腺苷酸受体A2a和可溶性细胞色素b562（5mzj.1A），序列一致性为20.79%。采用SWISS-PdbViewer 4.1.0软件将p.D578野生型模型的第578位氨基酸由天冬氨酸变成组氨酸，并比对两者构象的差异，发现第578位氨基酸突变后，可与周围氨基酸形成新的β折叠，蛋白空间结构发生变化。见图3。

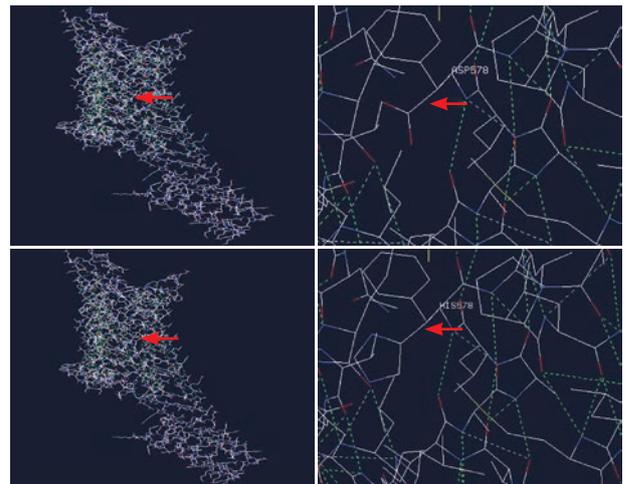


图3 p.D578H突变前后空间结构预测图 A、B为野生型蛋白结构模型；C、D为突变后蛋白结构模型。当第578位氨基酸由天冬氨酸变成组氨酸后，周围氨基酸形成了新的β折叠，蛋白空间结构发生变化（箭头所示）。

2.6 治疗与结局

家长签署知情同意后，给予患儿口服第三代芳香化酶抑制剂来曲唑联合螺内酯治疗。用药半年后，患儿阴茎增长及生长速率得到明显控制，未再有阴茎勃起，骨龄增加0.6岁。未见明显的药物不良反应。

3 讨论

在本研究中,检测了1位患有外周性早熟
的10个月大男婴的性早熟相关基因,结果提示,
其LHCGR基因的11号外显子发生了杂合突变
(c.1732G>C),导致第578位密码子编码的氨基
酸由天冬氨酸变为组氨酸。该突变在之前未被报
道过,为一新突变。

LHCGR基因位于染色体2p21,基因全长
70 kb,包括11个外显子和10个内含子,其编
码的蛋白是具有7个跨膜片段的G蛋白配体受体
大家族的成员。研究发现LHCGR基因的突变可
以是激活性的(可致男童FMPP),也可以是失活
性的(可致男性性分化障碍或女性无排卵)。1993
年Shenker等^[2]和Kremer等^[3]分别报道了LHCGR
基因突变与FMPP的联系。迄今为止,所有已知
的LHCGR基因的激活性突变都是由单个碱基替
换造成的错义突变,共18种,具体包括L368P、
A373V、M398T、L457R、I542L、D564G、
D564V、A568V、M571I、A572V、I575L、T577I、
D578Y、D578G、D578E、D578A、C581R及
C617Y^[4-5]。这些突变均位于第11外显子中,
1624~1741位碱基被认为是LHCGR基因激活性
点突变的热点突变区,即绝大部分突变发生在第
5和第6个跨膜螺旋区或连接两者的胞浆环,编
码571~581之间的氨基酸。其中最常见的是第
6跨膜区的第578位的天冬氨酸被甘氨酸代替
(D578G),该突变主要见于美国FMPP患者,占
美国报道病例约90%^[6]。同时,中国报道的5例
导致FMPP的基因突变类型中,4例为LHCGR基
因M398T突变^[7-8],另外1例为A568V突变^[9],提
示不同的人种LHCGR基因突变类型有明显差异。

人类的LHCGR属于G蛋白偶联受体家族成
员,正常情况下,LH与睾丸Leydig细胞上的LH
受体结合,激活cAMP,促使睾酮的合成增加。而
FMPP患儿,LHCGR不需与配体LH结合,而呈
持续性激活,导致细胞内的非LH依赖性的cAMP
增加,Leydig细胞持续合成分泌睾酮。既往文献报
道在男性性早熟患者中检测到LHCGR基因第578
位由天冬氨酸突变的包括以下4种类型,p.D578Y、
p.D578G、p.D578E、p.D578A突变。研究发现
p.D578A突变,可导致基底细胞内cAMP增加3~5

倍^[2,10]。2010年Nagasaki等^[11]报道了一位6岁的
FMPP患儿,基因检测发现其存在LHCGR基因的
c.1850G>A(p.C617Y)突变;随后Nagasaki在
COS-1细胞系中突变了LHCGR基因第1850位碱
基,验证其功能,结果提示p.C617Y突变导致基
底细胞内cAMP比野生型受体增加15%^[11]。结合
点突变后cAMP升高程度与相应的临床症状分析,
一般情况下,FMPP患者年龄在1~4岁之间发病,
出现生长加速和骨骼进展。Nagasaki等^[11]报道的
患儿在6岁时才逐渐出现相应的临床症状,且其
病情发展并不迅速。而在本病例中,患儿从6个
月大时就出现了明显的阴茎发育过快,伴生长加
速及骨骼进展,且伴有出现阴茎勃起及阴毛,发
病时间早,且疾病进展迅速。考虑这些临床表现
可能反映了患者LHCGR突变体的独特特征,即不
同突变位点导致LH受体持续激活的能力不同,导
致疾病的发病早晚及严重程度不一致,578位氨基
酸突变引起LH受体持续激活的能力较强。但关于
LHCGR基因c.1732G>C(p.D578H)突变仍需进
一步的功能验证,明确其激活LHCGR的能力。

本例具有典型的临床表现,6个月大时出现阴
茎增粗及生长加速,阴茎6.0 cm×1.9 cm,短
时间即出现阴茎勃起及阴毛,睾酮水平明显增高。
10个月大时骨龄即加速至3岁,睾丸增大,但GnRH
兴奋试验呈青春期前反应,可与中枢性早熟相
鉴别。除中枢性早熟,外周性早熟需与先天性
肾上腺皮质增生症、McCune-Albright综合征、
芳香化酶缺乏症、肿瘤相关的性早熟等疾病相
鉴别,因而本课题组在临床上检测了孕酮、促肾
上腺皮质激素、17-羟孕酮、雄烯二酮、硫酸脱
氢表雄酮、皮质醇、甲胎蛋白、癌胚抗原,同时
做了肾上腺B超及垂体MRI,结果均未见异常。
在基因分析时,检测了相关致病基因,包括CDKL5、
CYP11B1、CYP17A1、CYP19A1、CYP21A2、
ESR1、FSHR、GNAS、HSD3B2、IGF1、KDM6A、
KISS1、KISS1R、KMT2D、LHCGR、MKRN3、
POR、SHBG、STAR、STK11,从基因上排除了
上述基因突变导致疾病的可能性,最后通过基因
分析,发现患儿LHCGR基因第11外显子发生
了c.1732G>C(Asp578His)突变,最终确诊为
FMPP。

FMPP患儿由于骨骺过早闭合而导致成年矮

身材, 治疗上主要是将体内雌激素抑制到青春期前水平, 以达到抑制骨龄快速进展的目的。在家属签署知情同意书后, 我们选择了第3代芳香化酶抑制剂来曲唑联合抗雄激素制剂螺内酯治疗。用药半年后随访, 患儿阴茎增长及生长速率得到明显控制, 未再有阴茎勃起, 骨龄增加0.6岁, 且未见明显的药物不良反应。除成年身高外, FMPP患者还可能会出现生育问题及肿瘤相关问题。在1998年Martin等^[12]报道了1例因LHCGR基因突变(p.D578G)发生FMPP的患儿, 其在35岁时被诊断为睾丸精原细胞瘤。在本病例中, 该患儿同样发生了LHCGR基因578位氨基酸的突变, 因此该患儿的远期病情进展仍需进一步密切随访观察。

综上所述, 本文通过基因检测发现FMPP患儿LHCGR基因发生c.1732G>C(Asp578His)突变, 该突变在之前并未被报道过。该突变导致患儿发病早, 病情进展迅速, LHCGR基因突变分析可为患者分子诊断、家系遗传咨询及产前诊断提供实验依据。联用第3代芳香化酶抑制剂和抗雄激素制剂可有效控制症状。

[参 考 文 献]

[1] Schedewie HK, Reiter EO, Beitins IZ, et al. Testicular leydig cell hyperplasia as a cause of familial sexual precocity[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1981, 52(2): 271-278.
[2] Shenker A, Laue L, Kosugi S, et al. A constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty[J]. Nature, 1993, 365(6447): 652-654.
[3] Kremer H, Mariman E, Otten BJ, et al. Cosegregation of missense mutations of the luteinizing hormone receptor gene

with familial male-limited precocious puberty[J]. Hum Mol Genet, 1993, 2(11): 1779-1783.
[4] Themmen AP. An update of the pathophysiology of human gonadotrophin subunit and receptor gene mutations and polymorphisms[J]. Reproduction, 2005, 130(3): 263-274.
[5] Nagasaki K, Katsumata N, Ogawa Y, et al. Novel C617Y mutation in the 7th transmembrane segment of luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor in a Japanese boy with peripheral precocious puberty[J]. Endocr J, 2010, 57(12): 1055-1060.
[6] Laue L, Chan WY, Hsueh AJ, et al. Genetic heterogeneity of constitutively activating mutations of the human luteinizing hormone receptor in familial male-limited precocious puberty[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(6): 1906-1910.
[7] 茅江峰, 伍学焱, 聂敏, 等. 生殖细胞系黄体生成素受体基因杂合突变(M398T)导致家族性男性性早熟[J]. 中华内科杂志, 2010, 49(12): 1024-1027.
[8] 苏喆, 马华梅, 李燕虹, 等. 由LHCGR基因杂合突变(M398T)所致家族性男性限性早熟[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2012, 33(5): 639-643, 654.
[9] 陈瑞敏, 张莹, 杨晓红, 等. 家族性男性性早熟一家系LHCGR基因突变分析[J]. 中华医学遗传学杂志, 2012, 29(6): 631-634.
[10] Yano K, Hidaka A, Saji M, et al. A sporadic case of male-limited precocious puberty has the same constitutively activating point mutation in luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor gene as familial cases[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1994, 79(6): 1818-1823.
[11] Nagasaki K, Katsumata N, Ogawa Y, et al. Novel C617Y mutation in the 7th transmembrane segment of luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor in a Japanese boy with peripheral precocious puberty[J]. Endocr J, 2010, 57(12): 1055-1060.
[12] Martin MM, Wu SM, Martin AL, et al. Testicular seminoma in a patient with a constitutively activating mutation of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor[J]. Eur J Endocrinol, 1998, 139(1): 101-106.

(本文编辑: 万静)