

· 临床研究 ·

21-羟化酶缺乏症女婴 6 例临床特点 及表型-基因型关联分析

王会贞, 卫海燕, 毋盛楠, 沈凌花, 杨海花, 陈永兴

郑州大学附属儿童医院 河南省儿童医院 郑州儿童医院内分泌遗传代谢科, 河南 郑州 450052

摘要: **目的** 探讨 21-羟化酶缺乏症(21-OHD)女婴临床特点、基因突变类型及表型基因型的关联,以期为 21-OHD 表型-基因型的关联提供新的证据,为 21-OHD 儿童的分子诊断及个体化管理提供依据。**方法** 回顾分析 2016 年 1 月至 2018 年 4 月经郑州儿童医院内分泌遗传代谢科确诊的 6 例 21-OHD 女婴的临床和基因检测资料。采用 Sanger 测序和多重连接探针扩增技术,对 CYP21A2 基因外显子区域检测点突变和大片段缺失,分析临床表型与基因型的相关性。**结果** 6 例女婴多以外生殖器异常及体重不增就诊,其中 5 例属于失盐型,1 例属于单纯男性化型。5 例失盐型基因检测结果分别为 I2G/Ex. 1-7del(1 例)、I2G/I2G(2 例)、I2G, p. Q319X/p. R357W(1 例)、p. Q319X/I2G(1 例),均属于基因型 Group A;1 例单纯男性化型基因检测结果为 I2G/p. I173N,属于基因型 Group B。本研究表型-基因型关联支持率为 100%。**结论** 女婴出现外生殖器畸形伴体重不增就诊时应考虑先天性肾上腺皮质增生症诊断,应及时完善相关实验室检查以明确诊断,并进一步行基因检测,以制定更加个体化的管理及随访方案。女婴 21-OHD 基因型-表型关联度较高。同时也提示推广 21-OHD 新生儿早期筛查工作的必要性。

关键词: 肾上腺皮质增生症, 先天性; 21-羟化酶缺乏症; 基因突变; 基因型

中图分类号: R 586 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2019)01-0081-04

Clinical characteristics and phenotype-genotype correlation in female infants with 21-hydroxylase deficiency: an analysis of 6 cases

WANG Hui-zhen, WEI Hai-yan, WU Sheng-nan, SHEN Ling-hua, YANG Hai-hua, CHEN Yong-xing

Department of Endocrinology and Genetic Metabolism, Children's Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450052, China

Corresponding author: WEI Hai-yan, E-mail: haiyanwei2009@163.com

Abstract: **Object** To explore the clinical characteristics, gene mutation type, phenotype-genotype correlation of 21-hydroxylase deficiency (21-OHD) in female infants to provide new evidence for phenotype-genotype correlation of 21-OHD and for molecular diagnosis and individual management of 21-OHD children. **Methods** The data of clinical and genetic testing of 6 female infants with 21-OHD diagnosed definitely by Zhengzhou Children's Hospital from January 2016 to April 2018 was retrospectively analyzed. Using Sanger sequencing and multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), point mutation and large deletion in exon region of CYP21A2 gene were detected to analyze the relationship between clinical phenotype and genotype. **Results** Six female infants presented mainly with external genital abnormalities and no weight gain, of which 5 cases belonged to phenotype of salt wasting, and 1 case belonged to phenotype of simple virilizing (SV). Genetic testing results for 5 cases of salt wasting phenotype were respectively I2G/Ex. 1-7del(1 case), I2G/I2G (2 cases), I2G, p. Q319X/p. R357W(1 case), p. Q319X/I2G(1 case), which all belonged to group A mutation, and I2G/p. I173N for one simple SV type, which belonged to group B mutation. In the six cases, the support rate of phenotype-genotype correlation was 100%. **Conclusions** The diagnosis of congenital adrenal hyperplasia should be considered when the baby has an external genital malformation with weight loss. The relevant laboratory tests and further genetic testing should be completed in time to make a definite diagnosis, and further genetic testing must be carried out in order to formulate a more individualized management and follow-up plan. The genotype and phenotype has a good consistency in 21-OHD female infants. It also suggests the necessity of promoting early screening of 21-OHD newborns.

Key words: Adrenal hypoplasia, congenital; 21-hydroxylase deficiency; Gene mutation; Genotype

先天性肾上腺皮质增生症 (congenital adrenal hypoplasia, CAH) 是一组由编码皮质激素合成必需酶基因突变致肾上腺皮质类固醇激素合成障碍所引起的疾病, 为常染色体隐性遗传病, 约 95% 的 CAH 是由于 21-羟化酶缺乏导致, 即 21-羟化酶缺乏症 (21-hydroxylase deficiency, 21-OHD), 国内外报道其发病率为 1/10 000 ~ 1/20 000^[1]。根据临床表型不同, 21-OHD 可分为失盐型 (salt wasting)、单纯男性化型 (simple virilizing) 和非典型型 (nonclassic)。21-OHD 是由于编码类固醇的 CYP21A2 基因突变所致。CYP21A2 基因定位于人类 6 号染色体短臂的人类白细胞抗原 III (HLA III 区, 6p21.3), 与其无活性的假基因 CYP21A1P 串联排列在 C4A 和 C4B 基因的 3' 端, 两者相距 30 kb, 真假基因均有 10 个外显子, 9 个内含子, CYP21A2 基因与假基因高度同源, 外显子和内含子同源性分别达 98% 和 96%, 该区域为高度易变区域, 是 21-OHD 相对发生率高的分子基础^[2]。关于 21-OHD 基因型表型间关联的研究很多, 但表型 - 基因型间关联的支持率报道不尽一致, 如 p. Q319X 及 p. R357W 突变主要和失盐型表型相关联, c. 292-13A/C > G (the intron 2 splice site mutation, I2G) 及 p. I173N 突变既可导致失盐型也可导致单纯男性化型表型^[3-4]。因此需要进一步研究探索表型 - 基因型间的关联。

本研究报道在我科就诊的 6 例 21-OHD 女婴的首次就诊原因、临床症状体征、实验室检查结果、基因突变类型, 并进一步探索表型 - 基因型关联的支持率, 以期对 21-OHD 表型-基因型关联提供新的证据, 同时, 为 21-OHD 儿童的个体化诊疗及管理提供依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象 以郑州儿童医院 2016 年 1 月至 2018 年 4 月临床诊断的 6 例 21-OHD 女婴为研究对象, 其诊断均经过基因检测明确。由两名内分泌遗传代谢科副主任医师根据患儿临床表现、激素水平及既往病史对患儿的临床表型进行归类。分为: 失盐型、单纯男性化型和非典型型。所有检查均获得患儿家长或监护人的知情同意, 且本研究项目经过郑州儿童医院医学伦理委员会的批准。

1.2 基因检测方法 采用 Sanger 测序和多重酶联依赖探针扩增 (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA), 对 CYP21A2 基因的点突变和大片段缺失、重复进行检测。采集先证者及母亲外周血 5 ml, EDTA 抗凝, 用 Qiagen 公司试剂盒提取基因组

DNA the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), -20 °C 保存。

采用苯酚-氯仿的方法从患儿及父母的外周血白细胞中抽提 DNA。PCR 扩增相关基因外显子及旁侧内含子区域, PCR 反应总体系为 25 μ l, 含提取基因 DNA 1 μ l、10 \times Buffer 2.5 μ l、Tap DNA 聚合酶 1.25 U、2.5 mmol/L dNTP 2 μ l、10 μ mol/L 上、下游引物各 1 μ l。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 30 个循环, 末次循环后, 72 °C 延伸 5 min, 冷却至 4 °C。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。电泳后产生清晰可见、大小符合预期的条带。将 DNA 进行片段化, 然后进行 DNA 建库, 对目标 DNA 进行捕获, 用 Illumina HiSeq X Ten 高通量测序仪进行测序, 测序读长为 2 \times 150 bp。测序数据运用 NextGene V2.3.4 软件与 UCSC 数据库提供的人类基因组 hg19 参考序列进行比对, 并对目标区域的覆盖度和测序质量进行评估。依据严格的筛选标准对变异进行过滤, 并添加 HGMD 数据库、蛋白功能预测软件的相关注释信息。对变异位点注释, 筛选可能有害的突变, 对可能有害的突变进行 Sanger 测序验证。对经 Sanger 测序仅发现 CYP21A2 基因一个突变位点或未能发现突变位点的患儿, 进一步采用 MLPA (PO50) 检测基因外显子缺失/重复突变, 并以正常 DNA 作为对照, 数据采用 Coffalyser 软件分析 (基因检测由北京信诺佰世医学检验所提供技术支持)。

2 结果

2.1 临床资料 6 例女婴均为足月顺产, 所有患儿出生体重均 > 2.5 kg, 均为单胎, 生后即有下列部分或全部症状: 胃纳差、反复呕吐、腹泻、腹胀等消化道症状, 体重增长不良, 外生殖器畸形, 皮肤黏膜色素沉着等, 确诊年龄为 32 ~ 90 d, 均未进行 21-OHD 新生儿筛查。例 1 以“发现外生殖器异常伴体重增长不良 3 月”为代主诉入院; 例 2、3、4、5 均以“发现外生殖器异常伴体重增长不良 1 月余”为代主诉入院; 例 6 以“发现外生殖器异常 2 月余”为代主诉入院。根据 CAH 临床表型分类标准, 例 1 ~ 5 均存在体重增长不良、消化道症状、失盐症状 (低钠血症、高钾血症)、女性外阴两性畸形, 同时其血清学指标促肾上腺皮质激素 (ACTH)、17-羟孕酮 (17-OHP) 均有升高, 符合失盐型表型, 例 6 患儿存在女性外阴两性畸形, 血清 17-OHP 升高, 但无失盐证据, 属于单纯男性化型。见表 1。

2.2 基因型分类及表型 - 基因型关联分析 6 例女

表 1 6 例 21-OHD 女婴临床资料

病例序号	性别	确诊年龄	主诉	临床表型	血钾 (mmol/L)	血钠 (mmol/L)	ACTH (pg/ml)	17-OHP (ng/ml)
1	女	90 d	外生殖器异常伴体重增长不良 3 月	失盐型	8.07	106.40	280.00	162.00
2	女	46 d	外生殖器异常伴体重增长不良 1 月余	失盐型	6.30	119.00	105.00	122.00
3	女	38 d	外生殖器异常伴体重增长不良 1 月余	失盐型	5.84	122.60	318.40	79.72
4	女	40 d	外生殖器异常伴体重增长不良 1 月余	失盐型	6.54	124.40	380.00	312.00
5	女	32 d	外生殖器异常伴体重增长不良 1 月余	失盐型	6.88	122.00	90.00	92.00
6	女	71 d	外生殖器异常伴体重增长不良 2 月余	单纯男性化型	5.15	137.00	78.00	69.00

表 2 6 例 21-OHD 女婴临床表型及基因型

病例序号	确诊年龄	临床表型	基因型(父源/母源)	基因型分组
1	90 d	失盐型	I2G/Ex. 1-7del	Group A
2	46 d	失盐型	I2G/I2G	Group A
3	38 d	失盐型	I2G/I2G	Group A
4	40 d	失盐型	I2G, p. Q319X/p. R357W	Group A
5	32 d	失盐型	p. Q319X/I2G	Group A
6	71 d	单纯男性化型	I2G/p. I173N	Group B

共检出 13 个突变位点 5 种突变: I2G、p. R357W、p. Q319X、大片段缺失、p. I173N。根据 21-OHD 基因型分类,例 1~5 属于 Group A 突变,例 6 属于 Group B 突变。对于 CAH 表型-基因型关联,已有文献报道多数支持 Group A 与失盐型有关联,Group B 与单纯男性化型有关联,故本研究中 CAH 表型-基因型关联支持率为 100%。见表 2。

3 讨论

本研究例 1~5 女婴均以“外生殖器异常+体重不增”为主要表现,存在严重电解质紊乱,属于失盐型;例 6 因“外生殖器异常”就诊,无失盐表现,属于单纯男性化型。本研究中 6 例女婴确诊年龄在 3 个月以内,提示对于女性小婴儿,如果出现外生殖器异常及体重不增,应考虑 21-OHD 的存在,研究结果同时支持外生殖器异常是 21-OHD 女婴早发现、早就诊的原因。值得注意的是,目前就诊的患儿均因生后发现明显临床症状,甚至发生肾上腺危像后方来就诊,增加了新生儿性别误判,甚至是死亡风险。根据 2016 年出台的《CAH 新生儿筛查共识》^[1],提示在我省推广 21-OHD 新生儿早期筛查工作的必要性。

根据突变基因 CYP21A2 残余酶活力,可将 CAH 患者基因型分为 5 种^[3]: Group Null、A、B、C、D。Group Null 包括导致酶完全失活的双等位基因突变(基因缺失, p. G111Vfs * 21, E6 cluster, p. L308Ffs * 6, p. Q319X, p. R357W); Group A 包括纯合 I2G(残余酶活性极低)或杂合 I2G(与 0 组突变类型杂合); Group B 包括纯合 p. I173N 突变(2% 酶活性残留)或杂合 p. I173N 突变(与 0 组或 A 组突变类型杂合); Group C 是指携带轻度损害的突变,如 p. V282L 和 p. P31L(残余酶活性 20%~60%),纯合或者杂合

(与 0 组、A 组或 B 组突变类型杂合); Group D 指那些对酶活性影响尚不明确的突变类型。根据已有研究报道,与 Group Null 及 Group A 相关的预测临床表型为失盐型,与 Groups B 及 Group C 相关的预测临床表型为单纯男性化型及非典型型^[5]。约 95% 的 CYP21A2 基因缺陷可归纳为三种类型:(1)约 65%~70% 为缺失突变,源于小基因转换导致的假基因 CYP21A1P,包括 I2G [IVS-13 A/C -> G (28%)], p. I173N (9%), p. V282L (9%), p. Q319X (4%), p. R357W (4%), E6 cluster [p. I235N, p. V236E, p. M238K (4%)], p. G110Vfs * 21 (3%), p. P31L (2%) 和 p. L308Ffs * 6 (1%)。(2)约 5% 为自发点突变。(3)约 25%~30% 为不等减数分裂导致的大型基因重排^[6]。本研究 6 例女婴共检出 13 个突变位点 5 种突变: I2G、p. R357W、p. Q319X、大片段缺失、p. I173N,突变类型多属于基因转换或大片段缺失,提示 I2G 为 21-OHD 女婴的常见突变位点,与整体人群报道一致^[1,5,7-8],同时,本研究获得的突变谱和热点突变与相关报道基本一致^[9-11],符合常染色体隐性遗传规律。相关报道显示,Del, p. Q319X、p. R357W 突变会导致翻译出的蛋白质整体结构的改变,从而造成 21-羟化酶活性完全丧失,属于严重突变类型,与失盐型临床表型相关;p. I173N 突变残余酶活性为 2%,与 SV 临床表型相关^[3,5,11]。本研究 6 例 CAH 女婴中,病例 1~5 基因型均属于 Group A,根据基因型可预测其表型为失盐型,与实际的临床表型一致(100%);病例 6 的基因型属于 Group B,根据基因型可预测其表型为单纯男性化型,与实际的临床表型一致(100%)。

根据 2015 年日本修订的 21-OHD 的诊断及治疗指南^[12],21-OHD 疾病严重程度和基因型相关,因此基因检测对此类患者尤为重要。该指南建议,经典型 21-OHD 新生儿期的初始治疗中,糖皮质激素的需要量需高于维持治疗剂量以迅速减少肾上腺雄激素的产生,同时建议在成长儿童的维持治疗阶段使用氢化可的松,同时避免使用长效糖皮质激素。对于失盐型患儿,建议使用氟氢可的松及氯化钠治疗。对于 21-

OHD 儿童的管理随访,该指南推荐对所有年龄段儿童进行身高、体重和血压的常规评估,并在 1 岁后定期检测骨龄,同时在固定时间(早上使用糖皮质激素之前)进行内分泌相关检查。这对本研究 6 例女婴的治疗及随访有重要参考意义。

综上所述,本研究对 6 例 21-OHD 女婴的临床症状、实验室结果的分析提示,临床工作中发现阴蒂肥大的女婴,特别是同时存在体重不增、有消化道症状者均应考虑 21-OHD 的可能,应及时完善电解质、17-OHP、ACTH 等检查从而明确诊断,并进一步行基因检测,以明确基因突变类型,以提供更加个体化的管理及随访方案。同时也提示推广 21-OHD 新生儿早期筛查工作的必要性。本研究存在一定局限性,病例数较少,未来需要扩大样本量,同时需加强这部分儿童的随访及管理,以明确基因型与远期表型、激素治疗效果之间的关联,以加深对该疾病的认识。

参考文献

[1] 中华预防医学会出生缺陷预防与控制专业委员会新生儿筛查学组,中国医师协会青春期医学专业委员会临床遗传学组,中华医学会儿科学分会内分泌遗传代谢学组. 先天性肾上腺皮质增生症新生儿筛查共识[J]. 中华儿科杂志,2016,54(6):404-409.

[2] Vrzalová Z, Hrubá Z, Hrabincová ES, et al. Chimeric CYP21A1P/CYP21A2 genes identified in Czech patients with congenital adrenal hyperplasia[J]. Eur J Med Genet,2011,54(2):112-117.

[3] Wang R, Yu Y, Ye J, et al. 21-hydroxylase deficiency-induced congenital adrenal hyperplasia in 230 Chinese patients: genotype-phenotype correlation and identification of nine novel mutations[J]. Steroids,2016,108:47-55.

[4] New MI, Abraham M, Gonzalez B, et al. Genotype-phenotype correlation in 1,507 families with congenital adrenal hyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,2013,110(7):2611-2616.

[5] Finkelstein GP, Chen W, Mehta SP, et al. Comprehensive genetic analysis of 182 unrelated families with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency[J]. J Clin Endocrinol Metab,2011,96(1):E161-E172.

[6] Xu Z, Chen W, Merke DP, 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.

[7] 韩连书. 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):410-413.

[8] Choi JH, Jin HY, Lee BH, et al. Clinical phenotype and mutation spectrum of the CYP21A2 gene in patients with steroid 21-hydroxylase deficiency[J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes,2012,120(1):23-27.

[9] Chan AO, But WM, Ng KL, et al. Molecular analysis of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in Hong Kong Chinese patients[J]. Steroids,2011,76(10/11):1057-1062.

[10] Ma D, Chen Y, 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.

[11] Zhang B, Lu L, Lu Z. Molecular diagnosis of Chinese patients with 21-hydroxylase deficiency and analysis of genotype-phenotype correlations[J]. J Int Med Res,2017,45(2):481-492.

[12] Mass Screening Committee, Japanese Society for Pediatric Endocrinology, Japanese Society for Mass Screening, et al. Guidelines for diagnosis and treatment of 21-hydroxylase deficiency (2014 revision) [J]. Clin Pediatr Endocrinol,2015,24(3):77-105.

收稿日期:2018-05-22 修回日期:2018-06-20 编辑:石嘉莹