

# 先天性甲低患儿相关基因突变及胰岛素样生长因子结合蛋白表达的研究

周 逵<sup>1</sup>,李素丽<sup>2</sup>,叶彩虹<sup>3</sup>

(1. 北京大学深圳医院检验科,广东 深圳 518000; 2. 深圳市妇幼保健院中心实验室,广东 深圳 518000; 3. 深圳康宁医院检验科,广东 深圳 518000)

**摘要:** 为了解先天性甲状腺功能减退症患儿相关基因突变以及胰岛素样生长因子结合蛋白(IGFBP-3)表达水平,选取 100 例先天性甲状腺功能减退症患儿为观察对象,并选取同期 67 例正常儿童作为对照。结果发现,与正常儿童比较,先天性甲状腺功能减退症患儿 IGFBP-3 水平显著降低,另有 10 例双氧化酶 2(DUOX2)基因的第 28 外显子基因存在突变,另有 30 例第 17 外显子基因突变。表明先天性甲状腺功能减退症患儿存在 DUOX2 基因突变和 IGFBP-3 水降低。

**关键词:** 先天性; 甲状腺功能减退症; 基因突变; 蛋白; 氨基酸

中图分类号:R722 文献标识码:A

## Gene mutations and expression of insulin-like growth factor binding protein in children with congenital hypothyroidism

ZHOU Kui<sup>1</sup>, LI Suli<sup>2</sup>, YE Caihong<sup>3</sup>

(1. Department of Laboratory, Shenzhen Hospital, Peking University, Shenzhen 518000, Guangdong, China; 2. Central Laboratory, Shenzhen Maternal and Child Health Hospital, Shenzhen 518000, Guangdong, China; 3. Department of Laboratory, Shenzhen Kangning Hospital, Shenzhen 518000, Guangdong, China)

**Abstract:** To examine the relationship between gene mutations related with congenital hypothyroidism and level of insulin-like growth factor binding protein (IGFBP-3), 100 children with congenital hypothyroidism were selected as observed subjects and 67 normal children as the control group. Results showed, compared to control, the expression of IGFBP-3 was lower in the observed group, the mutation of DUOX2 gene was found in the 28th exon factor (the ratio is 10%) and in the 17th exon (the ratio is 30%) in the observed group. These results indicated there is a DUOX2 gene mutation and decreased expression of IGFBP-3 in the children with congenital thyroid dysfunction.

**Key words:** congenital; hypothyroidism; gene mutation; protein; amino acid

先天性甲状腺功能减退症是临床最常见的新生儿内分泌疾病之一,会引起自身代谢障碍、生理功能低下及智力障碍等问题<sup>[1-3]</sup>,其主要发病原因为患儿的甲状腺激素合成减低或发育不全引起<sup>[4-5]</sup>,碘元素代谢以及甲状腺激素合成与分泌等过程的基因突变与甲状腺激素合成低下具有密切关系。既往有研究表明,双氧化酶 2 (dualoxidase2, DUOX2) 基因突变会导致先天性甲状腺功能减退症的发生<sup>[6-8]</sup>。同时,研究表明,胰岛素样生长因子结合蛋白(insulin-like growth factor binding proteins-3,

IGFBP-3) 水平会对生长发育水平产生影响<sup>[9-10]</sup>,推测甲状腺激素水平与 IGFBP-3 水平存在某种关联。故本研究选取 100 例先天性甲状腺功能减退症患儿的临床资料进行回顾性研究分析,探讨先天性甲状腺功能减退症患儿相关基因突变以及 IGFBP-3 蛋白表达水平。

## 1 资料与方法

### 1.1 一般资料

选取 2015 年 1 月至 2018 年 6 月 100 例先天性甲状腺功能减退症患儿作为研究对象。纳入标准:

(1) 婴幼儿筛查中促甲状腺激素超过 20  $\mu\text{IU}/\text{mL}$ ;  
 (2) 先天性甲状腺功能减退症患儿诊断标准符合《2014 年欧洲儿科内分泌学会先天性甲状腺功能减退症指南介绍》<sup>[11]</sup>;  
 (3) 患儿甲状腺位置正常且肿大;  
 (4) 患儿监护人知情并签署知情同意书;排除标准:(1) 新生儿未合并其他严重疾病;(2) 患儿家属依从性差。选取入组的 100 例先天性甲状腺功能减退症患儿作为观察组,年龄范围为 2 个月至 3 岁,平均年龄为 (1.76 $\pm$ 0.55) 岁,平均出生体重 (3449.00 $\pm$ 452.35) g;其中男性 21 例,女性 79 例;选取同期 67 例正常婴幼儿作为对照组,年龄范围为 2 个月至 3 岁,平均年龄为 (1.69 $\pm$ 0.58) 岁,平均出生体重 (3456.00 $\pm$ 452.66) g;其中男性 14 例,女性 53 例;比较两组患者平均年龄、平均出生体重以及性别等一般资料差异不具有统计学意义 ( $P>0.05$ ),具有可比性。本次研究内容经我院伦理学会批准执行。

## 1.2 方法

采集婴幼儿外周静脉血 5 mL 放置于柠檬酸钠

抗凝管中,采用贝克曼 DNA 提取试剂盒进行全血清提取患儿外周血基因,并利用微量紫外分光光度计对提取的患儿 DNA 进行纯度以及浓度检测,其中 OD 数值提示为 1.79 至 1.98 之间,浓度不低于 60.0  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ,浓度最高不超过 368.8  $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。根据系统软件设计引物扩增 DUOX2 外显因子,其合成引物由系统对应公司提供,见表 1。其 PCR 反应体系是由 20 $\mu\text{L}$ PCR 反应缓冲液中含有 200 nM dNTPs 进行反应,在 80 ng DNA 模板上,其上、下游引物分为 0.5  $\mu\text{M}$  以及 1.25 U Taq 聚合酶,其 PCR 反应条件为:95  $^{\circ}\text{C}$  5 min,94  $^{\circ}\text{C}$  45 s,55 至 65  $^{\circ}\text{C}$  45 s,72  $^{\circ}\text{C}$  45 s,72  $^{\circ}\text{C}$  7 min,降温至 4 $^{\circ}\text{C}$ 。PCR 产物使用同位素标记法对基因进行测序。所有婴幼儿于入院清晨空腹采集静脉血 5 mL,经过离心后分离血清测定 IGFBP-3,采用 DRG International 公司免疫放射试剂盒(型号:FREE-001)以及中科中佳科学仪器有限公司的  $\gamma$  免疫计数器(型号:GC-911)进行检查。

表 1 DUOX2 基因的引物

| 外显子   | 上游引物                       | 下游引物                      |
|-------|----------------------------|---------------------------|
| 1+2   | 5-CATAGAGGACGCCCTCAG-3     | 5-GGGAGCGCATAAGATTGC-3    |
| 4     | 5-GGACGTTTGTACAGTATGGC-3   | 5-GGGGAGGGACGAGCGGTA-3    |
| 7+8   | 5-CCCATCTGTGCAACC-3        | 5-CCCAAGGCAGCTCATCT-3     |
| 11    | 5-CGTAGTGCCAATAGTCG-3      | 5-ATCAGTAAATGGGAAA-3      |
| 13    | 5-GTGACTTCTACTTCTCCAAC-3   | 5-CCCTGAACTGTCTCCCTC-3    |
| 16    | 5-GGGACATCTGCTGAATACCC-3   | 5-TCGCTGACCTTCTGCTT-3     |
| 18+19 | 5-TCTTCCCTCCCTCTCT-3       | 5-TTTGAAGGTGATGCTCT-3     |
| 21    | 5-AAGGGAGGAGGGCCAGT-3      | 5-CATCCAGCGCATAGGG-3      |
| 23    | 5-ATGGACAAAGACAGAAGAA-3    | 5-ACATAGCTTGGCACAGG-3     |
| 26    | 5-GCCAGCAGGAAAGGAGTC-3     | 5-CAAGAGCAGGATGTAGAGGTG-3 |
| 29    | 5-AGAGGACAGGTGCCATCA-3     | 5-CAGGACAGCTGCCAAG-3      |
| 31    | 5-GGCCTCTGCTGGGACTGT-3     | 5-GCCATCTGCTTACGCT-3      |
| 3     | 5-GGGAAGGTTCTGTCAGTGAAGT-3 | 5-GTTGGGAGTCGGATGGGT-3    |
| 5+6   | 5-AGGCCAACCGTGACGG-3       | 5-CTTGCACGCGAAGGGAG-3     |
| 9+10  | 5-GCCACTGCTCAATCTAG-3      | 5-GTCCCTTACCATCCCC-3      |
| 12    | 5-GCAGCAAACATACGCCAC-3     | 5-GAATCAGGGCTCATAGGG-3    |
| 14+15 | 5-ACAGTTTCAGGGATGG-3       | 5-TCTGTAACCTGTCTTTCTC-3   |
| 17    | 5-AGGCTGAAGCAGGGTC-3       | 5-CACCGAATCTCACACA-3      |
| 20    | 5-CACCTACCCAGCCTGAC-3      | 5-AAAAATGCCTCTTCTCT-3     |
| 22    | 5-TTCATTTTGTGCGCC-3        | 5-CTCAGGATGGTCGTTAT-3     |
| 24+25 | 5-CACCTGTGCCAACTGAT-3      | 5-AGCCAGGAGAAACCATC-3     |
| 27+28 | 5-GGGGAATGTGCTGTTGTC-3     | 5-AAGATTTGGCCTCTGTG-3     |
| 30    | 5-TGTCTCCGTTTCTGTC-3       | 5-CCTCAAGTTTGGCATCT-3     |
| 32+33 | 5-AGTGTGCCCCGACTGT-3       | 5-CCTAGGTGGATTCTGATGGA-3  |

### 1.3 统计学方法

所有数据资料均采用 SPSS20.0 软件对数据进行统计分析。计量资料数据用的形式表示,行正态性和方差齐性检验后,组间计量资料比较采用独立样本 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 DOUX2 基因外显因子结果

有 10 例先天性甲状腺功能减退症患者存在 DUOX2 基因第 28 外显因子发现基因突变,有 30 例

先天性甲状腺功能减退症患者存在 DUOX2 基因第 17 外显因子发现基因突变,其他先天性甲状腺功能减退症患者均未发现相关基因突变。经过生物信息学分析表明,DUOX2 第 28 外显子会导致精氨酸变为组氨酸,见图 1;DUOX2 第 17 外显子会导致组氨酸变为精氨酸,见图 2。

### 2.2 两组 IGFBP-3 水平

与正常对照组相比,观察组患儿 IGFBP-3 水平显著降低,差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),说明先天性甲状腺功能减退症患者存在 IGFBP-3 水平不足,见表 2。

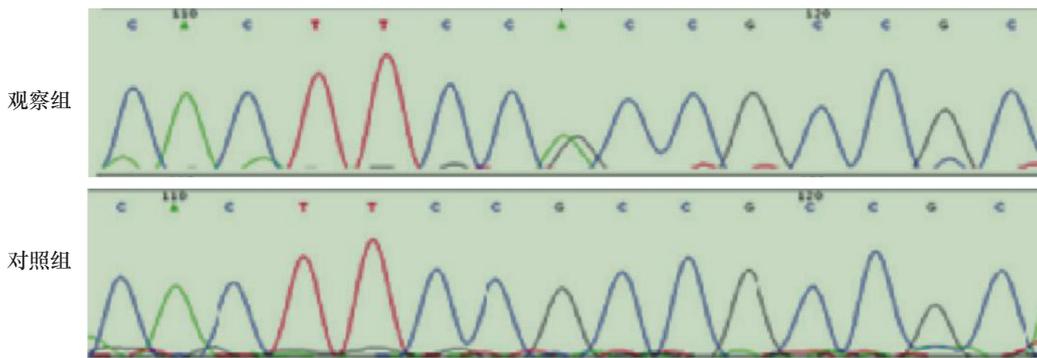


图 1 DOUX2 第 28 外显因子部分测序图

观察组基因突变测序图,其突变点为 A/G 杂合双峰;对照组基因测序图为 GG 符合

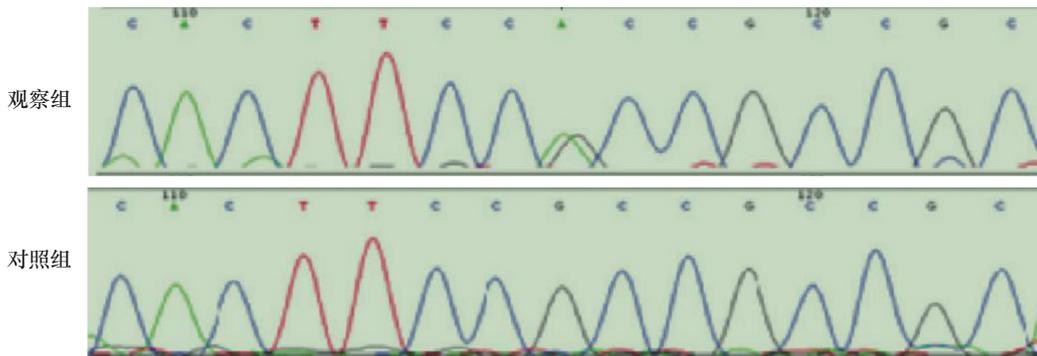


图 2 DOUX2 第 17 外显因子部分测序图

观察组基因突变测序图,其突变点为 C/T 杂合双峰;对照组基因测序图为 GG 符合

表 2 两组患儿 IGFBP-3 水平

| 组别  | n   | IGFBP-3 (μg/L)           |
|-----|-----|--------------------------|
| 对照组 | 67  | 2.31 ± 0.66              |
| 观察组 | 100 | 1.41 ± 0.54 <sup>a</sup> |

与对照组相比,<sup>a</sup> $P < 0.05$

## 3 讨 论

先天性甲状腺功能减退症是新生儿最常见的

内分泌疾病之一,早期缺乏典型临床症状表现,但如果不能对患儿进行及时诊断以及正确治疗,会对患儿的神经、骨骼等系统的生长发育造成严重影响<sup>[12-15]</sup>。新生儿先天性甲低经过早期筛查能够及时诊断以及治疗其疾病<sup>[16-18]</sup>。先天性甲状腺功能减退症的病因有甲状腺缺乏、发育不良或异位等障碍,然而大多数患儿的发病机制尚不明确。碘元素的氧化以及有机化是甲状腺激素合成的主要缓解以及限速阶段,该过程需要 TO 以及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的参与。

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 由 DUOX2 基因催化形成,若 DUOX2 在过程中发生突变,造成合成 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的功能缺失,进而导致碘元素不能氧化以及有机化,进而导致先天性甲状腺功能衰退症<sup>[19]</sup>。

随着研究逐渐开展,已发现多种不同类型的 DUOX2 的基因突变。本次研究中有 10 例先天性甲状腺功能衰退症患者存在 DUOX2 基因第 28 外显子发现基因突变以及有 30 例存在第 17 外显子发现基因突变。经过生物信息学分析,DUOX2 第 17、28 外显子发生氨基酸突变,导致患儿蛋白质的改变。但新生儿胎儿期的生长发育与正常胎儿无明显差别,考虑胎儿期来自母体的甲状腺素基本能够保证胎儿的生长发育,羊水细胞因子能够有效防止患儿出现甲状腺缺乏引起的严重中枢神经系统损害以及骨骼出现异常,同时能够解释患儿为何在新生儿期尚缺特征性症状。而出生后不久的新生儿 IGFBP-3 表达水平出现降低。本次研究结果显示,观察组患儿 IGFBP-3 水平明显低于对照组;提示先天性甲状腺功能衰退症患者的蛋白水平会受到影响,其主要考虑因素仍是患儿基因突变导致患儿蛋白质空间结构的改变,导致其蛋白质功能不全,故提示 DUOX2 基因的突变可能引起蛋白质功能的改变进而影响 IGFBP-3 的合成,传导或者表达导致先天性甲状腺功能衰退症。IGFBP-3 水平出现降低可能是患儿出生后出现生长发育迟缓的原因,并且,部分学者研究表明<sup>[20-21]</sup>,若短期替代治疗,能使 IGFBP-3 正常,能够保证甲状腺激素能恢复到正常水平,使患儿正常生长。

综上所述,本研究发现先天性甲低患儿 IGFBP-3 水平降低,并且 DUOX2 基因会发生突变,结合现有学者研究成果,DUOX2 基因突变可认定为导致 IGFBP-3 水平降低的主要原因,是导致甲状腺激素分泌不足,造成患儿生长发育迟缓,采取相关治疗提高患儿 IGFBP-3 水平,对患儿进行 IGFBP-3 水平的早判断以及治疗具有重要临床意义。

#### 参考文献:

- [1] 黄永兰,谭敏沂,蒋翔,等.疑似甲状腺素合成障碍性永久性先天性甲状腺功能减低症患者 TPO、DUOX2 及 DUOX2A 基因突变分析[J].中华儿科杂志,2017,55(3):210-4.
- [2] FU C, LUO S, LONG X, et al. Mutation screening of the GLIS3 gene in a cohort of 592 Chinese patients with congenital hypothyroidism. [J]. Clinica Chimica Acta, 2017,476(12):38-43.
- [3] 何逸飞,王奇金. Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路相关蛋白的检测对甲状腺癌患者及临床意义[J].中南医学科学杂志,2018,46(4):417-9.
- [4] AYCACANN Z, CANGUL H, MUZZA M, et al. Digenic DUOX1 and DUOX2 mutations in cases with congenital hypothyroidism: [J]. J Clinical Endocrinol & Metabol,2017,102(9):3085-90.
- [5] 梁新萍,蔡仁梅,刘文森,等.先天性甲状腺功能减退症患者 GLIS3 基因突变研究[J].中华实用儿科临床杂志,2018,33(8):585.
- [6] MML K, LOUZADA RA, MITNE-NETO M, et al. DUOX2 Mutations are associated with congenital hypothyroidism with ectopic thyroid gland[J]. J Clinical Endocrinol & Metabol, 2017,102(11):4060.
- [7] 崔文霞,朱有志,郑珂,等.甲状腺乳头状癌 BRAFV600E 基因突变与蛋白表达的临床研究[J].中华实验外科杂志,2018,35(3):522.
- [8] 董丽儒,杨虎,李双,等.甲状腺乳头状癌 BRAF V600E 基因突变及相关蛋白的表达[J].中国癌症杂志,2017,27(4):251.
- [9] 李智勇,李兴华,欧阳常理,等. IGF-I、IGFBP-3 诊断矮小儿童生长激素缺乏的价值[J].放射免疫学杂志,2013,26(5):614-6.
- [10] 范良华.小于胎龄矮小患儿生长激素治疗与 IGF-1 及 IGFBP-3 水平的相关研究[J].浙江中西医结合杂志,2016,26(6):558-60.
- [11] LEGERJ, OLIYIERIA, DONALDSONM, et al. 2014 年欧洲儿科内分泌学会先天性甲状腺功能减退症指南介绍[J].国际内分泌代谢杂志,2016,36(6):44.
- [12] SUN F, ZHANG JX, YANG C Y, et al. The genetic characteristics of congenital hypothyroidism in China by comprehensive screening of 21 candidate genes[J]. Eur J Endocrinol, 2018,178(6):EJE-17-1017.
- [13] 朱子鹏,张爱龙,肖雪明,等.甲状腺乳头状微小癌中鼠类肉瘤滤过性病毒致癌同源体 B1 基因 V600E 位点突变及半乳糖凝集素-3、间皮表面微绒毛抗原、细胞角蛋白 19 表达特征研究[J].中华实验外科杂志,2017,34(12):2209.
- [14] ZOU M, ALAZHRANI A S, AL-ODALB A, et al. Molecular analysis of congenital hypothyroidism in Saudi Arabia: SLC26A7 mutation is a novel defect in thyroid dysmorphogenesis [J]. J Clinical Endocrinol & Metabol, 2018,103(5):77
- [15] 律玉强,薛宁,张开慧,等.一例甲状腺激素合成障碍性先天性甲状腺功能减退症患者的 DUOX2 基因变异分析[J].中华医学遗传学杂志,2018,35(6):836.
- [16] FAN X, FU C, SHEN Y, et al. Next-generation sequencing analysis of twelve known causative genes in congenital hypothyroidism. [J]. Clinica Chimica Acta,2017,468(5):76-80.
- [17] 郑维晖,龚巍巍,陆凤,等.甲状腺癌相关基因突变和表观遗传学研究进展[J].中华流行病学杂志,2017,38(11):44-5.
- [18] ESTEPHAN E D P, TOMASELLI P J, MAEQUES W, et al. A common CHRNE mutation in Brazilian patients with congenital myasthenic syndrome[J]. J Neurol,2018,265(3):1-6.
- [19] 孙秀娟,李海燕,李大鹏,等.遗传性球形红细胞增多症红细胞膜蛋白基因突变的临床特征研究[J].中华血液学杂志,2018,39(11):912.
- [20] 王凤玲,邓海荣,刘玉枝,等.碘致甲状腺功能异常及其与 IGF-1 和 IGFBP-3 表达的研究进展[J].医学综述,2018,24(09):1676-80.
- [21] 徐旭,何勇,沙红,等.甲状腺功能减退症患者血清生长激素、胰岛素样生长因子-I、胰岛素样生长因子结合蛋白-3 水平的变化[J].实用儿科临床杂志,2007(8):603-4.

(本文编辑:秦旭平)