

· 短篇论著 ·

烟台市新生儿先天性甲状腺功能低下症病因学分析研究

吕志萍 董淑萍 梁晨

【摘要】 目的 通过对先天性甲状腺功能低下症(CH)患儿甲状腺核素扫描和血清学变化分析、对新生儿促甲状腺激素(TSH)升高与母亲孕期甲状腺功能状态变化的比较、对确诊CH患儿DUOX2基因测序筛查,探讨新生儿CH的病因分类。**方法** 采集1998~2010年烟台市新生儿出生72h后血样滴于滤纸上,筛查试验采用时间分辨荧光标记法测定TSH含量,确诊试验采用化学发光法测定血清TSH、游离三碘甲腺原氨酸(FT3)、游离甲状腺素(FT4)浓度水平,利用放射性核素扫描确定甲状腺形态、位置。对确诊CH患儿的DUOX2基因全部外显子进行基因突变筛查,结合测序验证及生物信息学进行分析。**结果** 523 462例新生儿中确诊CH 372例,其中永久性CH 216例,暂时性CH 151例,高TSH血症5例。在372例CH中,只有218例同意做了甲状腺核素扫描,包括永久性CH 162例,暂时性CH 56例。甲状腺形态基本正常的CH血清TSH、FT3、FT4含量与甲状腺形态和功能异常者有统计学差异($P < 0.01$),新生儿血TSH升高与其母亲中孕期间甲状腺功能异常相关($P < 0.01$)。在确诊的CH患儿中,检测到2例甲状腺肿大患儿的DUOX2基因的外显子发生突变。第1例突变发生在DUOX2基因第三外显子(c. 227C>T),第2例在第13外显子发生突变(c. 1621C>A)。**结论** CH患儿的甲状腺形态、位置改变不同,血清TSH、FT3、FT4表达水平不同;新生儿TSH升高与其母亲孕期甲状腺功能呈正相关;DUOX2基因突变可引起CH。此研究不仅有利于CH患者的早期诊断,而且有利于开展产前诊断,提高出生人口素质。

【关键词】 先天性甲状腺功能减退症; 血清学; 甲状腺形态; DUOX2基因; 病因分析

先天性甲状腺功能低下症(congenital hypothyroidism, CH)是国内外新生儿疾病筛查的主要疾病之一,该病是由于在胚胎期或出生前后期甲状腺轴的发生、发育和功能代谢异常,引起出生后甲状腺功能减退。CH按照病因主要分为两类,第一类是甲状腺不发育、发育不全或异位,是造成先天性甲状腺功能减退最主要的原因。新生儿甲状腺功能状态与其母亲妊娠期营养、甲状腺功能等生理状态密切相关。第二类是甲状腺激素合成障碍,多见于参与甲状腺激素合成和分泌过程中酶(过氧化物酶、偶联酶、脱碘酶及甲状腺球蛋白合成酶等)的编码基因发生突变而导致甲状腺素不足,多为常染色体隐性遗传病。多种基因可导致甲状腺激素合成缺陷。而以常染色体隐性方式遗传的DUOX2基因突变越来越受到国外学者关注,目前国内却没有该方面研究。烟台市自1998年开始开展新生儿筛查工作至今共筛查新生儿523 462例,对确诊的CH患儿进行病因学分类,并确定甲状腺发育、形态、位置变化与血清促甲状腺激素(TSH)、游离三碘甲腺原氨酸(FT3)、游离甲状腺素(FT4)表达水平的关系,探讨新生儿TSH升高与母亲中孕期甲状腺功能状况关系。对部分确诊CH患儿进行基因突变筛查,分析研究常见的DUOX2基因突变类型和特点。对新生儿CH的病因分析、治疗和预后判断提供依据。对开展产前诊断,提高出生人口素质具有重要意义。

一、对象与方法

1. 研究对象:收集1998年8月1日至2010年8月31日我市辖区的各级医院住院分娩的活产儿523 462例,确诊CH 372例。在372例CH患儿中,只有218例做了甲状腺扫描,对甲状腺形态基本正常的69例、发育不良的8例、缺如的25例、异位的92例、肿大的19例CH患儿进行血清学分析比较。收集部分新生儿母亲中孕时期的抗凝血标本,冷冻血清。在其新生儿筛查之后,有选择性的进行甲状腺功能检测。在确诊的372例CH中,选取100例,其中甲状腺肿大的19例,缺如的22例,异位的59例,年龄在2~12岁的CH患儿进行基因突变筛查。

2. 筛查试验:采集新生儿出生后3~7d足跟血于Schleicher&Schleicher 903滤纸上,阴凉处自然晾干,放塑料袋密封0~4℃保存,并递送至本实验室统一检测。CH筛查试验采用时间分辨荧光标记法测定干血片中TSH含量,本实验室的切值为10 μU/ml。初筛结果大于本实验室切值即为可疑阳性。立即召回做确诊试验。

3. 确诊试验:采集可疑新生儿静脉血2 ml,分离血清上机,全自动化学发光法测定血清TSH、FT3、FT4的浓度,若TSH升高、FT4降低即被确诊为CH。确诊的CH患儿立即给予去甲状腺素片治疗。2岁之内每3个月复查一次,根据血清学水平调整用药剂量。治疗至2周岁后停药一个月,复查TSH、FT3、FT4。若三项指标恢复正常,则考虑为暂时性CH,若仍为异常则确

诊为永久性 CH。给予终生治疗,并每半年复查一次,包括血清学检测、身高、体重、骨龄和智力的监测。

4. 基因检测分析:采集 CH 患儿抗凝血 2 ml,采用酚氯仿抽提方法提出基因组 DNA,采用 Primer 5 软件设计 24 对引物,分别扩增 DUOX2 共 34 个外显子。引物贮存液浓度为 100 nmol/μl,工作液浓度为 10 nmol/μl。PCR 反应条件:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,54 ~ 62 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,共循环 35 次;循环完成后 72 °C 过延伸 10 min,降温至 4 °C。用 2% 的琼脂糖凝胶电泳观察 PCR 产物扩增情况。DNA 测序:PCR 扩增产物由上海申速生物有限公司进行测序,计算机软件自动处理数据,以波形和碱基序列输出测序结果。

5. 甲状腺核素扫描:CH 患儿在 2 岁后停止治疗一个月,利用放射性核素扫描确定甲状腺的形态。

6. 新生儿母亲在中孕期甲状腺功能参数:TSH、总三碘甲腺原氨酸(TT3)、总甲状腺素(TT4)、FT3、FT4、甲状腺过氧化物酶抗体(TPO)。母亲甲状腺功能参数 1 项异常,即视为甲状腺功能有可能异常。作为课题前瞻性设计。

7. 统计学分析:血清学 TSH、FT3、FT4 含量以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 示差异有统计学意义。新生儿 CH 与母亲甲状腺功能,采用 χ^2 检验,配对资料的关联性分析。用 VECTOR NTI 软件可将患儿标本 DUOX2 基因测序结果与数据库中的信息进行基因序列比对,从中可能发现患儿 DUOX2 基因新的突变位点,为分析 DUOX2 基因突变类型和特点提供依据。

二、结果

1. CH 的发病率:1998 年 8 月 1 日至 2010 年 8 月 31 日,共筛查新生儿 523 462 例,可疑阳性为 2268 例,召回可疑患儿 2229 例,确诊 CH 患儿 372 例。筛查可疑阳性率 0.4%,召回率 98.2%,确诊阳性率 1:1407。其中男女比例为 1:1.26。

2. 甲状腺核素扫描情况:218 例 CH 患儿甲状腺静态显像情况见表 1。

表 1 218 例 CH 患儿甲状腺静态显像结果

甲状腺改变	例数	比例(%)
基本正常	69	31.62
发育不良	8	3.75
异位	92	42.20
缺如	25	11.46
下丘脑垂体性	4	1.83
肿大	19	8.70
单叶	1	0.50
合计	218	100

3. 血清 TSH、FT3、FT4 表达水平与甲状腺形态学改变的关系:经甲状腺核素扫描的 CH 患儿治疗前血清学 TSH、FT3、FT4 浓度水平见表 2。

表 2 213 例 CH 患儿血清学表达水平($\bar{x} \pm s$)

甲状腺改变	例数	TSH(ng/L)	FT3(ng/ml)	FT4(ng/ml)
基本正常	69	50.29 ± 49.62	5.85 ± 2.21	16.86 ± 12.82
发育不良	8	97.08 ± 96.86 ^a	4.73 ± 1.84 ^a	12.19 ± 9.64 ^a
缺如	25	149.22 ± 85.71 ^{ab}	2.23 ± 2.00 ^{ab}	5.68 ± 4.65 ^{ab}
异位	92	121.35 ± 110.51 ^{ab}	2.39 ± 1.78 ^{ab}	8.77 ± 6.90 ^{ab}
肿大	19	102.11 ± 98.37 ^a	3.48 ± 3.07 ^a	4.99 ± 4.53 ^a

注:与基本正常比较,^a*P* < 0.01;与发育不良比较,^b*P* < 0.01

4. 新生儿 TSH 升高与母亲中孕期甲状腺功能变化关系:随机检测了 450 例正常新生儿母亲中孕期甲状腺功能情况,有 8 例有可疑表现,异常率为 1.78%。225 例可疑 CH 患儿母亲中有 15 例有可疑表现,异常率为 6.67%。100 例确诊 CH 患儿母亲有 17 例有可疑表现,异常率 17%。经 χ^2 检验,三组间母亲甲状腺功能异常率比较,差异有统计学意义(*P* < 0.01)。确诊新生儿 TSH 升高与母亲甲状腺异常相关。相关参数见表 3。

5. 确诊 CH 基因突变筛查:在 100 例确诊的 CH 患儿中,我们在 2 例甲状腺肿大的患儿中检测到 DUOX2 基因发生了突变,第一例 DUOX2 基因第三外显子中,第 227 位碱基 T 被碱基 C 替代(c. 227C > T),导致该处脯氨酸被亮氨酸取代(P76L);第二例 DUOX2 基因第十三外显子发生同义突变,即 DUOX2 c. 1621C > A (R541R)。经过生物信息学分析后发现这些氨基酸的改变均位于 DUOX2 蛋白的非保守性位点(图 1 ~ 2)。

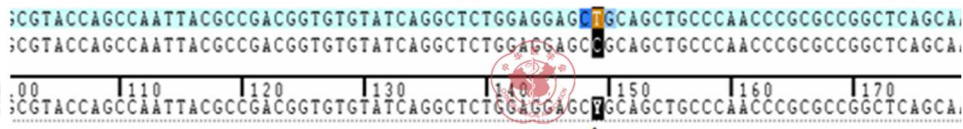


图1 第一例 DUOX2 c.227 C>T (P76L) 测序图

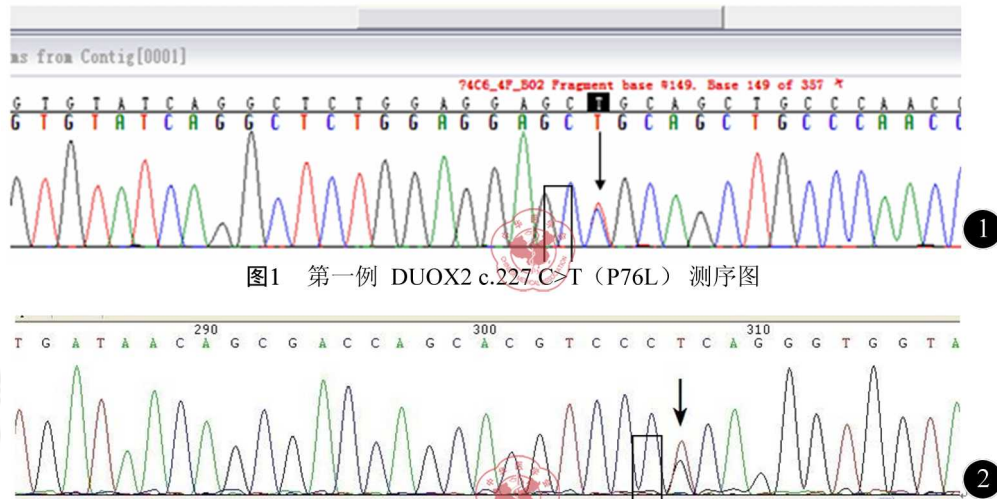


图2 第二例 DUOX2 c.1621 C>A (R541R) 反向测序图

三、讨论

据本次调查,我市新生儿CH的发病率为1:1407。发达国家的发病率在1:7000~1:3000^[1],在2004年上海召开的国际新生儿疾病筛查学会第五届亚太地区会议上我国报告最新统计的CH发病率为1:2178^[2],山东省的发病率为1:2831^[3]。我市的发病率高于全国水平。我市暂时性CH的发病率约为0.18%,与欧洲0.13%~0.50%水平接近,但高于国内报道0.11%的水平^[4]。原因之一,据烟台大众网健康频道2010年8月15日预防免疫部门统计报道,烟台市虽然是沿海城市,但也是碘缺乏地区。

表3 新生儿TSH升高与母亲甲状腺功能变化相关参数(例)

项目	例数	TSH ^a		TT3		TT4 ^b		FT3		FT4 ^c		TPO-Ab	
		异常	正常	异常	正常	异常	正常	异常	正常	异常	正常	异常	正常
确诊	100	8	92	0	100	2	98	1	99	4	96	2	98
可疑+正常	675	10	665	4	671	1	674	0	675	2	673	6	669
χ ² 值		16.31		0.59		7.74		6.75		15.55		1.05	
P 值		<0.01		>0.05		<0.01		<0.01		<0.01		>0.05	

注:TSH异常与对照组,^ar=5.78;TT4异常与对照组,^br=13.75;FT4异常与对照组,^cr=14.02

CH的诊断目前分为一般性诊断和甲状腺核素扫描诊断。一般性诊断主要是通过实验测定血液TSH、FT3、FT4浓度水平,确定甲状腺功能低下的程度和性质,目前国内主要是通过血清学做出确诊。病因学诊断,主要包括放射性核素甲状腺扫描,以明确甲状腺的发生、发育及功能情况。本研究发现所有存在甲状腺异常的患儿除极个别外,均为永久性CH,并且血清学变化明显异常。放射性核素甲状腺扫描对诊断永久性CH非常有效^[5]。但是在我院确诊的CH患儿中,只有2/3左右做了甲状腺核素扫描,并且是初筛值显著异常的患儿,所以本报道统计的器官性病变更高。

甲状腺是人类最早发育的内分泌器官,自妊娠第12孕周起,胎儿甲状腺即开始吸收碘^[6],至妊娠第20~22孕周,调节甲状腺分泌的下丘脑-垂体-甲状腺轴基本发育完善。甲状腺在胚胎时期发育情况,直接影响新生儿出生后甲状腺功能。同时,由于新生儿在胚胎发育早期所需要甲状腺素主要来自母体,因此,孕妇甲状腺功能状态直接影响胚胎早期胎儿甲状腺的发育情况。本研究结果显示,可疑CH的新生儿母亲甲状腺功能异常率高于正常新生儿母亲,阳性患儿母亲明显高于可疑患儿母亲。可见,母亲甲状腺功能异常与新生儿TSH值升高成正相关。但是研究人数只是课题设计,随着标本量的增多比例会有所变化,因为孕妇甲状腺功能检测不是孕期必查保健内容,所以不能做系统的统计分析。

编码DUOX2的基因位于人类第15号染色体上,含有33个外显子,cDNA长度为6.4 kb。其翻译的DUOX2蛋白由1548

个氨基酸组成,包括26个氨基酸信号肽。DUOX2蛋白位于甲状腺细胞的顶膜,与甲状腺过氧化氢(H_2O_2)的产生相关。在甲状腺激素合成过程中,TPO需要 H_2O_2 催化氨基酸残基的碘化和碘化氨基酸残基的耦合。一旦DUOX2发生基因突变,造成其功能异常,不能正常提供 H_2O_2 ,使碘不能有机化,甲状腺激素合成不足,这是导致CH的发病机制之一^[7]。国外文献报道已有二十多种基因突变。Vigone等^[8]研究了2例度过新生儿期的CH、局部碘有机化缺陷和轻微的长期高促甲状腺素血症同胞患者。患者是无义密码子突变(R842X)和错义突变(R376W)的杂合。由于体外的完全胞内保留,R376W成为了一个无效突变体,而使这些患者的DUOX2活性完全丧失。Varela等^[9]筛选了17例碘有机化缺陷的无亲缘关系的患者,发现了2例永久性CH患者有杂合DUOX2突变。其中一个杂合子是错义突变(Q36H),此突变在由DUOX2重组的异源系统中表达时使DUOX2的功能完全丧失,这表明了异种患者的DUOX2活性的完全丧失。2009年,Tonacchera等^[10]在一例永久性CH中发现了2个新的DUOX2突变(C2732T、G3155A)。因此,对于DUOX2基因的研究受到越来越多的关注。新生儿CH是可以早期治疗的新生儿疾病之一,新生儿筛查的宣传和政府相应的政策出台将有利于CH患者的早期诊断和提高出生人口素质。

参 考 文 献

- [1] American Academy of Pediatrics. AAP section on endocrinology and committee on genetics, and American thyroid association committee on public health: newborn screening for congenital hypothyroidism; recommended guidelines. *Pediatrics*, 1993, 91: 1203.
- [2] Jun LV. Present Status of Neonatal Screening in China. 5th Asia Pacific Regional Meeting of the International Society for Neonatal Screening, Shanghai, China, 2004.
- [3] Wang W, Chen XG, Zang JX, et al. Development of a newborn screening laboratory quality assurance system in Shandong, China. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2003, 34 suppl 3: 36.
- [4] Gu XF, de Rooij F, Voortman G, et al. Detection of eleven mutations causing acute intermittent Porphyria using denaturing gradient gel electrophoresis. *Hum Genet*, 1994, 93: 47-52.
- [5] 陈西贵, 韩晋华, 靳宪莲, 等. 先天性甲状腺功能低下症病因及治疗. *中国妇幼保健杂志*, 2005, 20: 1926.
- [6] 梁黎, 蒋优君, 曲一平, 等. 母亲患自身免疫性甲状腺疾病对婴儿的影响. *临床儿科杂志*, 2003, 21: 401-402.
- [7] Rivolta CM, Moya CM, Esperante SA, et al. The ethyroid as a model for molecular mechanisms genetic diseases. *Medicina (B Aires)*, 2005, 65: 257-267.
- [8] Vigone MC, Fugazzola L, Zamproni I, et al. Persistent mild hypothyroidism associated with novel sequence variants of the DUOX2 gene in two siblings. *Hum Mutant*, 2005, 26: 395.
- [9] Varela V, Rivolta CM, Esperante SA, et al. Three mutations (p. Q36H, p. G418fsX482. and g. IVS19-2A > C) in the dual oxidase 2 gene responsible for congenital goiter and iodide organification defect. *Clin Chem*, 2006, 52: 182-191.
- [10] Tonacchera M, De Marco G, Agretti P, et al. Identification and Functional Studies of Two New Dual-Oxidase2 (DUOX2) Mutations in a Child with Congenital Hypothyroidism and a Eutopic Normal-Size Thyroid Gland. *J Clin Endocrinol Metab*, 94: 4309-4314.

(收稿日期: 2011-07-13)

(本文编辑: 戚红丹)

吕志萍, 董淑萍, 梁晨. 烟台市新生儿先天性甲状腺功能低下症病因学分析研究[J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2011, 5(19): 5779-5782.