

甲状腺过氧化物酶基因 c. 2268dupT 突变与甲状腺结节的相关性研究

郭曼丽 李伟 马绍刚 仇亚丽 郑晓 耿宝花 张勇 俞伟男

【摘要】 目的 探讨先天性甲状腺功能减退症(先天性甲减)患者及其家系成员发生甲状腺结节与突变位点的关系。**方法** 58 例先天性甲减患者入选,提取外周血白细胞基因组 DNA,根据甲状腺功能及超声检查结果选择靶基因。PCR 扩增甲状腺过氧化物酶(TPO)、双氧化酶 2(DOIX2)、双氧化酶成熟因子 2(DOIXA2)、促甲状腺激素受体(TSHR)、钠/碘协同转运体(NIS)基因的所有外显子,对纯化 PCR 产物进行测序。发现突变后对其家系成员进行筛查。患者及家系成员行甲状腺功能和^{99m}Tc 甲状腺扫描或超声检查,然后分析 5 个基因的突变位点与甲状腺结节的关系。**结果** 16 例先证者为复合杂合子或纯合子,其中 10 例为 TPO 基因突变,含 c. 2268dupT 突变者 6 例。37 例家系成员为杂合突变,其中 TPO 基因突变 25 例。TPO 基因 c. 2268dupT 突变先证者及杂合携带者共 20 例,其中 12 例并发甲状腺结节。与其他所有突变位点组相比,c. 2268dupT 突变组的甲状腺结节患病率较高,差异有统计学意义($\chi^2 = 13.545, P < 0.01$)。**结论** TPO 基因 c. 2268dupT 突变为高频突变,该突变携带者发生甲状腺结节危险性较高。

【关键词】 先天性甲状腺功能减退症;基因突变;甲状腺结节

Relationship between c. 2268dupT mutation in thyroid peroxidase gene and thyroid nodules Guo Manli*, Li Wei, Ma Shaogang, Qiu Yali, Zheng Xiao, Geng Baohua, Zhang Yong, Yu Weinan. * Xuzhou Medical University, Xuzhou 221002, China

Corresponding author: Li Wei, Email: liwei.190@hotmail.com; Ma Shaogang, Email: mashaogang@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the relationship between thyroid nodules and mutations in patients with congenital hypothyroidism (CH) and their family members. **Methods** Fifty-eight patients with CH were enrolled. Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes. The target genes were selected according to the results of thyroid function and ultrasoundography. All exons of thyroid peroxidase (TPO), dual oxidase 2 (DOIX2), dual oxidase maturation factor 2 (DOIXA2), thyroid-stimulating hormone receptor (TSHR), and sodium/iodide symporter (NIS) genes were amplified selectively by PCR and the purified PCR products were sequenced directly. If a mutation was identified in a patient, the target fragment was also evaluated among his family members. All patients and their family members received thyroid function evaluation, thyroid ultrasound examination or ^{99m}Tc pertechnetate thyroid scan. Finally, the relationship between mutations in the above mentioned five genes and thyroid nodules was analyzed. **Results** Sixteen probands were complex heterozygous or homozygous. The TPO gene mutation were found in 10 probands including 6 cases who had c. 2268dupT mutation. Heterozygous mutation was found in 37 family members including 25 cases who had heterozygous mutations in TPO gene. The c. 2268dupT mutation of TPO gene was found in twenty cases including the probands and the heterozygous carriers, 12 of them had thyroid nodules. The prevalence of thyroid nodules in patients with c. 2268dupT mutation was higher than those with other mutations, and the difference was statistically significant ($\chi^2 = 13.545, P < 0.01$). **Conclusion** The

DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-4157.2017.04.004

作者单位:221002 徐州医科大学(郭曼丽);221002 徐州医科大学附属医院内分泌科(李伟);223002 徐州医科大学附属医院淮安医院内分泌科(马绍刚,郑晓,耿宝花,张勇,俞伟男);223800 宿迁市妇幼保健院新生儿筛查中心(仇亚丽)

通信作者:李伟,Email: liwei.190@hotmail.com;马绍刚,Email: mashaogang@163.com

c. 2268dupT mutation in TPO gene is a high frequency mutation in patients with CH. Persons with c. 2268dupT mutation are at high risk of thyroid nodules.

【Key words】 Congenital hypothyroidism; Gene mutation; Thyroid nodules

先天性甲状腺功能减退症(先天性甲减)是新生儿最常见的内分泌疾病,发病率约为 $1/3\ 000 \sim 1/2\ 000$,多为散发病例且病因不明,甲状腺发育不良和激素合成障碍均可致先天性甲减。80%的先天性甲减是由于甲状腺发育不良所致,少部分病例是基因突变所致,为常染色体隐性遗传。甲状腺发育不良涉及促甲状腺激素受体(TSHR)、甲状腺转录因子(TTF)-1、TTF-2、配对盒-8等基因突变。甲状腺激素合成障碍患者多是由于甲状腺过氧化物酶(TPO)、甲状腺球蛋白(Tg)、双氧化酶2(DUOX2)、双氧化酶成熟因子2(DUOXA2)、钠/碘协同转运体(NIS)、pendrin等基因突变所致^[1]。在中国先天性甲减患者中,TSHR、TPO、DUOX2、DUOXA2、NIS基因突变相对较多,而TTF-1、TTF-2、配对盒-8、Tg基因突变较少。

甲状腺结节是临床最常见的甲状腺疾病,病因复杂,极具异质性。流行病学调查显示,成人甲状腺结节超声检出率为19%~35%,而儿童和青少年检出率为0.2%~5.1%,成人甲状腺结节恶性率为5%,儿童则较高,为25%^[2]。因此需要关注先天性甲减家系成员的甲状腺结节患病情况,以便尽早发现肿瘤。

国外报道,经超声诊断先天性甲减婴幼儿甲状腺结节的患病率为4.2%,甲状腺腺体发育不良和甲状腺激素合成障碍均会增加甲状腺结节发生风险^[3]。笔者前期研究发现,TPO基因突变相当普遍,并且部分家系成员患有甲状腺结节^[4]。推测非自身免疫性甲状腺结节可能与遗传学突变相关。目前,国内、外将甲状腺结节与遗传学相结合的研究较少。因此,本研究拟从先天性甲减致病突变角度出发,探索遗传突变与甲状腺结节的关系。

1 对象与方法

1.1 对象 自2006年9月至2015年9月入选先天性甲减患者58例[男性25例,女性33例,年龄(6.75 ± 3.74)岁],均给予 $10\ \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 左甲状腺素片治疗。在常规随访过程中,根据甲状腺功能水平调整药物剂量。^{99m}Tc甲状腺扫描或超声检查显

示,58例患者中甲状腺发育不良36例,甲状腺肿12例,正常10例。经初步筛查先证者发现基因突变后,再对家系成员进行相应突变位点筛查,共42例家系成员入组(入组条件为与携带基因突变位点的先证者有血缘关系的三代内家系成员)。该试验通过了本医院伦理委员会审核(编号20140523),受试者本人或监护人均签署了知情同意书,中国临床试验注册:ChiCTR-CCS-14004734。

1.2 方法 首先抽取先天性甲减患者外周静脉血约3 ml, EDTA抗凝,采用TKM法提取基因组DNA^[5]。PCR选择性扩增TPO、DOUX2、DOUXA2、TSHR、NIS外显子,扩增产物纯化后直接测序,突变经正反测序证实,并对突变位点进行生物信息学分析。先天性甲减患者和家系成员均接受甲状腺功能和彩色多普勒超声检查。引物及测序由生物公司完成(北京中美泰和生物公司)。按基因突变位点将受试者分为c. 2268dupT突变位点组和其他所有突变位点组。

1.3 统计学处理 采用SPSS 18.0统计学软件进行统计分析。甲状腺结节患病率比较采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

58例先天性甲减患者中发现16例患者存在基因突变,来自于10个家庭。10例患者为TPO基因突变,其中含c. 2268dupT突变位点者占60.00%(6/10),5例为DUOX2及DUOXA2基因突变,1例为TSHR基因突变。对先证者所在的10个家系42例家系成员进行相应突变基因位点筛查,共发现37例家系成员携带杂合突变位点,其中25例杂合体为TPO基因突变,9例为DUOX2及DUOXA2基因突变,3例为TSHR基因突变(表1)。携带TPO基因c. 2268dupT突变的先证者及家系成员共20例,其中12例并发甲状腺结节,8例甲状腺无结节(表2)。将其他所有突变位点合并,与c. 2268dupT突变位点比较,后者甲状腺结节患病率较高,差异具有统计学意义($\chi^2 = 13.545, P < 0.01$),见表3。

表 1 先天性甲减患者及其突变家系成员基本情况

| 基因 | 突变位点 | 先证者 | | 杂合子 | |
|----------------|----------------------------|---------|-------|---------|---------|
| | | 样本(男/女) | 年龄(岁) | 样本(男/女) | 年龄(岁) |
| TPO | c. 2268dupT/p. G667S | 2(1/1) | 20/22 | 8(3/5) | 34 ± 23 |
| | c. 2268dupT/p. C756R | 1(1/0) | 4 | 2(1/1) | 30/29 |
| | c. 2268dupT/p. I657T | 1(1/0) | 6 | 2(1/1) | 38/40 |
| | c. 2268dupT | 2(2/0) | 10/5 | 5(2/3) | 37 ± 14 |
| | p. G889X/p. P883S | 1(0/1) | 3 | 4(2/2) | 42 ± 15 |
| | c. 2422delT/p. T561M | 2(1/1) | 1/3 | 4(3/1) | 40 ± 14 |
| | c. 670_672del | 1(0/1) | 5 | | |
| DUOX2 + DUOXA2 | p. R885L/p. Y246X | 2(0/2) | 1/2.5 | 4(2/2) | 40 ± 17 |
| | p. R885Q + c. 554 + 6C > T | 1(1/0) | 4 | 2(1/1) | 30/28 |
| | p. R885Q + p. Y246X | 2(2/0) | 4/4 | 3(1/2) | 26 ± 14 |
| TSHR | c. 392 + 4del4 + p. R528C | 1(1/0) | 2 | 3(1/2) | 32 ± 11 |

注:先天性甲减;先天性甲状腺功能减退症;TPO:甲状腺过氧化物酶;DUOX2:双氧化酶2;DUOXA2:双氧化酶成熟因子2;TSHR:促甲状腺激素受体

表 2 先证者及其家系成员携带不同基因突变者甲状腺超声检查结果

| 甲状腺超声 | TPO c. 2268dupT 突变(n=20) | TPO 非 c. 2268dupT 突变(n=15) | DUOX2 及 DUOXA2 p. R885L、 p. R885Q、p. Y246X、 c. 554 + 5C > T 突变(n=14) | TSHR p. R528C、 c. 392 + 4del4 突变(n=4) |
|--------------|-----------------------------|-------------------------------|--|---|
| 正常体积,无结节 | 3 | 7 | 9 | 0 |
| 正常体积,有结节,低回声 | 7 | 1 | 0 | 0 |
| 正常体积,有结节,等回声 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| 肿大,无结节 | 5 | 4 | 3 | 3 |
| 肿大,有结节,低回声 | 5 | 1 | 0 | 0 |
| 肿大,有结节,等回声 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 发育不良,无结节 | 0 | 0 | 2 | 1 |

注:TPO:甲状腺过氧化物酶;DUOX2:双氧化酶2;DUOXA2:双氧化酶成熟因子2;TSHR:促甲状腺激素受体

表 3 携带 c. 2268dupT 突变及其他所有突变位点者甲状腺结节患病率的比较

| 组别 | 例数 | 合并甲状腺结节者 | 患病率(%) | χ^2 值 | P 值 |
|---------------------|----|----------|--------|------------|-------|
| 携带 c. 2268dupT 突变位点 | 20 | 12 | 60.00 | 13.545 | <0.01 |
| 携带其他所有突变位点 | 33 | 4 | 12.12 | | |
| 合计 | 53 | 16 | 30.18 | | |

3 讨论

TPO 蛋白位于甲状腺滤泡上皮细胞的顶端膜侧,是甲状腺激素合成过程中的关键酶,可催化 Tg 上酪氨酸残基的碘化以及碘化酪氨酸残基的耦联,进而合成甲状腺激素^[6]。TPO 基因突变是导致甲状腺激素合成障碍最常见的病因,在有血缘关系的社区及家系调查中,TPO 基因突变也是相当常见的^[7-8]。因此,除了纯合子和复合杂合子发病外,人群中应该存在相当数量未发病的杂合子,即人群中 TPO 基因突变携带者的数量远大于发病者。而这些杂合子携带致病基因,处于“潜伏”状态,可能与某些甲状腺疾病有关。

笔者前期研究发现,TPO 基因突变是最常见的,在先天性甲减患者和家系成员中所占比例分别为 62.50% (10/16) 和 67.56% (25/37)。在中国台湾

和马来西亚华人中,TPO 基因 c. 2268dupT 突变为高频突变^[9-10]。在本研究中,c. 2268dupT 突变在先天性甲减患者及家系成员杂合体中所占比例分别为 60.00% (6/10) 和 56.00% (14/25)。目前认为这种高频突变的发生可能是奠基者效应所致。所谓奠基者效应是指后代中携带 c. 2268dupT 突变的基因频率较高是由于开始的几个或几十个个体基因频率导致的,引起后代遗传多样性降低,c. 2268dupT 突变出现频率较高,携带 c. 2268dupT 突变的后代人数较多^[8,11]。

TPO 基因 c. 2268dupT 突变产生移码突变,提前出现终止密码子,进而导致截短蛋白的产生。截短蛋白的产生可能会引起 TPO 蛋白部分功能区的丢失进而降低 TPO 活性,TPO 生物活性下降,可引起完全性或部分性碘有机化障碍^[12]。当合成缺陷导致的

甲状腺激素水平下降时,通过对垂体前叶负反馈调节,TSH 水平升高。长期高浓度 TSH 的刺激,可增加甲状腺结节的发生风险以及甲状腺结节发展成癌的风险^[6,12-13]。在本研究中,c.2268dupT 突变体甲状腺结节患病率显著升高,推测 c.2268dupT 突变体内大量截短蛋白的堆积,增加了甲状腺结节的发生风险。

甲状腺超声检查是诊断甲状腺结节的主要方法,同时有助于排除恶性甲状腺结节。根据回声性质可将甲状腺结节分为低回声、等回声、高回声。荟萃分析认为,低回声结节是甲状腺结节恶变的独立危险因素,而等回声或高回声结节恶变率较低^[14-15]。目前已有文献报道,先天性甲减患者 TPO 基因突变可能与甲状腺结节演变为癌有关^[16]。笔者曾经报道 1 例 TPO 基因 c.2268dupT 突变家系,其中 1 名亲属发生多灶性转移性甲状腺乳头状癌^[17]。在本研究中,14 例 c.2268dupT 突变体超声显示为低回声结节,因此对合并甲状腺结节者的随访是必不可少的。

诚然本研究存在一定不足,在先天性甲减患者及其家系调查中,TPO 基因为最常见的突变,而 DOUX2、DOUXA2、TSHR、NIS 基因突变较少见,因此将两者突变体间甲状腺结节患病率进行比较,存在一定的不均衡性。尚需要进行细胞功能验证的基础研究,以及扩大样本量的临床研究。

综上所述,本研究认为 TPO 基因 c.2268dupT 突变为高频突变,与甲状腺结节的发生相关。

参 考 文 献

- [1] Szinnai G. Clinical genetics of congenital hypothyroidism [J]. *Endocr Dev*, 2014, 26:60-78. DOI:10.1159/000363156.
- [2] Corrias A, Mussa A. Thyroid nodules in pediatrics: which ones can be left alone, which ones must be investigated, when and how [J]. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*, 2013, 5 (Suppl 1):57-69. DOI:10.4274/jcrpe.853.
- [3] Youn SY, Lee JH, Chang YW, et al. Characteristics of thyroid nodules in infant with congenital hypothyroidism [J]. *Korean J Pediatr*, 2014, 57(2):85-90. DOI: 10.3345/kjp.2014.57.2.85.
- [4] Ma SG, Wu XJ, Liu H, et al. Mutations of the thyroid peroxidase gene in Chinese siblings with congenital goitrous hypothyroidism [J]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2012, 56(9):614-617.
- [5] 马绍刚,方佩华,杨管岩,等. TSH 受体基因突变致先天性甲状腺功能减退症一例及其家系分析 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2006, 22(1):41-44. DOI:10.3760/j.issn:1000-6699.2006.01.014.
- [6] Umeki K, Kawano J, Yamamoto I, et al. Comparative analysis and characterization of mutated thyroid peroxidases with disturbance expressed on the cell surface [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2004, 223(1-2):77-84. DOI:10.1016/j.mce.2004.05.013.
- [7] Ba VN, Aycan Z, Cangul H, et al. A common thyroid peroxidase gene mutation (G319R) in Turkish patients with congenital hypothyroidism could be due to a founder effect [J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2014, 27(3-4):383-387. DOI:10.1515/jpem-2013-0203.
- [8] Cangul H, Aycan Z, Olivera-Nappa A, et al. Thyroid dysmorphogenesis is mainly caused by TPO mutations in consanguineous community [J]. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 2013, 79(2):275-281. DOI:10.1111/cen.12127.
- [9] Huang CJ, Jap TS. A systematic review of genetic studies of thyroid disorders in Taiwan [J]. *J Chin Med Assoc*, 2015, 78(3):145-153. DOI:10.1016/j.jcma.2014.09.010.
- [10] Lee CC, Harun F, Jalaludin MY, et al. Prevalence of c.2268dup and detection of two novel alterations, c.670_672del and c.1186C>T, in the TPO gene in a cohort of Malaysian-Chinese with thyroid dysmorphogenesis [J]. *BMJ Open*, 2015, 5(1):e006121. DOI:10.1136/bmjopen-2014-006121.
- [11] Niu DM, Hwang B, Chu YK, et al. High prevalence of a novel mutation (2268 insT) of the thyroid peroxidase gene in Taiwanese patients with total iodide organification defect, and evidence for a founder effect [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002, 87(9):4208-4212. DOI:10.1210/jc.2002-020153.
- [12] Lee CC, Harun F, Jalaludin MY, et al. Functional analyses of C.2268dup in thyroid peroxidase gene associated with goitrous congenital hypothyroidism [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014:370538. DOI:10.1155/2014/370538.
- [13] Grasberger H, Refetoff S. Genetic causes of congenital hypothyroidism due to dysmorphogenesis [J]. *Curr Opin Pediatr*, 2011, 23(4):421-428. DOI:10.1097/MOP.0b013e32834726a4.
- [14] Li RQ, Yuan GH, Chen M, et al. Evaluation of diagnostic efficiency of ultrasound features on malignant thyroid nodules in Chinese patients [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2016, 129(15):1784-1788. DOI:10.4103/0366-6999.186643.
- [15] Campanella P, Ianni F, Rota CA, et al. Quantification of cancer risk of each clinical and ultrasonographic suspicious feature of thyroid nodules: a systematic review and meta-analysis [J]. *Eur J Endocrinol*, 2014, 170(5):R203-R211. DOI:10.1530/EJE-13-0995.
- [16] Chertok Shacham E, Ishay A, Irit E, et al. Minimally invasive follicular thyroid carcinoma developed in dysmorphogenetic multinodular goiter due to thyroid peroxidase gene mutation [J]. *Thyroid*, 2012, 22(5):542-546. DOI:10.1089/thy.2011.0478.
- [17] Zhu H, Peng YG, Ma SG, et al. TPO gene mutations associated with thyroid carcinoma: case report and literature review [J]. *Cancer Biomark*, 2015, 15(6):909-913. DOI:10.3233/CBM-150522.

(收稿日期:2016-08-07)