

2 个非血缘关系家系的 3 例 CPHD 的 PROP1 基因缺失研究

张晓妍

(广东康怡司法鉴定中心, 广东 东莞 523039)

关键词: 垂体激素缺乏症; PROP1; 生长激素; 促甲状腺激素; 催乳素

中图分类号: R730

文献标识码: B

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2019.07.063

文章编号: 1006-1959(2019)07-0191-02

垂体激素缺乏症 (combined pituitary hormone deficiency, CPHD) 在临床主要是由于外伤、严重缺氧、手术期间损伤以及慢性疾病所造成的垂体活性抑制性疾病^[1]。从生物学角度分析^[2], 人体的垂体组织是由口腔顶部外胚层发育而来, 一般在患者的胚胎发育第 9 天, 形成垂体基板, 同时随着口腔外胚层的内陷, 逐步形成垂体囊原基, 同时, 在胚胎发育第 12 天, 囊原基闭合从口腔外胚层进行分离, 通过各种转录因子和信号通道在患者的垂体背部形成梯度分布, 最终分化为多个细胞体系^[3]。在近年来的研究中发现^[4], 垂体特异性转录因子祖蛋白 (Prophet of Pit-1, PROP1) 缺陷是该疾病在人群中最为常见的病因之一, 且在家族遗传性垂体激素缺乏症患者的检出率最高。PROP1 基因在胚胎发育的不同时期通过对细胞出现的时间和空间进行调控, 最终促使其分化为垂体激素分泌细胞^[5]。而人类的 PROP1 基因主要是由 3 个外显子以及 2 个内显子组成, 由上述外显子和内显子共同组成人体的垂体分泌细胞结构域, 当人提的该结构域发生突变或者缺陷时, 则会导致机体生长激素 (GH)、促甲状腺激素 (TSH) 以及催乳素 (PRL) 的分泌异常或缺乏, 以上生长发育的重要激素的缺乏在不同的生长发育阶段表现为严重的年龄差异, 80% 的患者可表现为生长发育迟缓^[6], 青春期肾上腺皮质功能表现为进行性加重。本研究将通过 2 个非血缘关系家系的 3 例 CPHD 的 PROP1 基因缺失研究, 为临床提供科学依据。

1 临床资料

研究对象为 3 例肾上腺激素缺乏患者, 女性患者 2 例, 男性患者 1 例, 其中 2 例女性患者的就诊年龄分别为 15 岁、16 岁, 男性患者就诊年龄为 22 岁。为研究方便, 将以上患者按照年龄大小依次编号为 A、B、C, 其中, A、B 患者为单卵双生, 于 3 岁发现身材矮小, 生长速度缓慢, 其生长速度平均为 1~2 cm/年, 剖腹产生产, 生产过程中未见宫内窘迫以及严重缺氧, 父母存在近亲结婚史, 父母身高及智力正常, A、B 2 例患者经血液检查, 均存在血清甲状腺激素、促甲状腺激素、性激素以及促肾上腺皮质激素分泌

降低等现象, 经骨龄测定, 2 例患者的骨龄均为 3.5 岁, C 患者为男性, 于 7 岁发现生长发育迟缓, 生长发育迟缓, 年平均生长速度为 2~3 cm, 患者足月生产, 生产过程中均无窒息、窘迫等疾病史, 父母近亲结婚, 性功能发育迟缓, 男性体征不明显, 患者经血液检查, 患者的甲状腺功能异常, 生长激素正常, 性激素分泌降低, 且患者的骨龄测定显示, 患者的骨龄测定为 10 岁。3 例患者经生长激素治疗后, 身高均升高 2~3 cm, 提示垂体激素、生长激素分泌异常。空腹抽取 3 例患者的血液 5 ml, 加入抗凝剂后, 对患者样品进行细胞裂解液处理, 混匀, 离心 (3600 r/min, 15 min), 取下层液体加入缓冲液混匀, 56℃水浴 10 min, 混匀, 使用 500 ml 异丙醇混匀, 再次离心, 弃去上清液, 加入 500 ml 乙醇溶液混匀后继续离心, 弃去上清液, 干燥提取 DNA, 加入 200 μl 缓冲溶液 TB, 65℃加热 1 h, 充分溶解 DNA 备检。使用实时荧光定量 PCR 仪器, 使用引物为 5'-ACCTACACACACATTGAGAGACAG-'3 进行 DNA 扩增^[7], 同时, 通过使用 geneloc 对患者的基因进行 PROP1 基因探查。使用琼脂糖凝胶进行电泳实验, 以正常人体的靶基因作为对照, 正常人体的提取 DNA 进行引物为 5'-ACCTACACACACATTGAGAGACAG-'3, 对正常人以及患者的 PROP1 基因的侧翼进行扩增分析, 扩增方法分别从 5' 以及 3' 的上游和下游进行, 扩增结束以患者的相邻序列出现“-”到“+”转变为止。在正常人体中均发现 GDB:314805STS、F4、F5、F1、F2、F3、RH102778STS、HR1、HR2、SQ1、SQ2、SQ3、SQ4、SQ5、SQ6、SQ7、HUMC5597STS、Q6ZTH3EXON1、SHGC-147122STS 等基因片段, 而在本研究患者中仅出现 F5 基因片段, 而在 SHGC-147122STS 和 Q6ZTH3EXON1 基因片段中, PROP1 基因外显子 1 出现明显扩增, 患者出现基因缺失片段就在该位置, 进而对 SHGC-147122STS 和 Q6ZTH3EXON1 之间的基因片段进行再次扩增, 发现正常人体和 3 例患者的 SQ2、SQ3、SQ5、SQ6、SQ7 基因片段大小一致。患者的 SQ1、SQ4 基因片段与正常人体出现明显的差异。3 例患者的电泳结果显示均未出现 SQ1 基因片段的目标条带。A、C 患者电泳结果显示出现拷贝量较小的 SQ4 基因片段, 而 B 患者电泳结果显示

作者简介: 张晓妍 (1991.11-), 女, 广东东莞人, 本科, 法医助理, 主要从法医物证鉴定工作

未出现 SQ4 基因片段。根据整体的基因扩增实验,以 PROP1 基因以及 PROP1 基因的侧翼进行检测,患者的缺失基因大小为 53kb。

2 讨论

研究显示,转录因子 PROP1 基因以及 PROP1 基因的侧翼的缺失是 CPHD 最为常见的病因之一^[9]。国外有学者对该疾病的研究中指出^[10],在对患者的集中监测中发现,患者的 PROP1 基因以及 PROP1 基因的侧翼的缺失占总体患者的 18.3%^[11],其中对垂体激素分泌异常家族史患者的检测中,PROP1 基因以及 PROP1 基因的侧翼的缺陷占比达到 47.1%^[12],针对散发患者的研究指出,PROP1 基因以及 PROP1 基因的侧翼的缺陷约占整体患者的 13.2%^[13],提示垂体激素分泌异常的患者具有一定的家族遗传倾向。

本研究中,通过对 3 例患者的 PROP1 基因以及 PROP1 基因的侧翼进行分析,患者的 PROP1 基因均发生缺失性突变,所有患者的电泳结果显示,PROP1 基因 3 个外显子均表现为缺失,对 3 例患者的 PROP1 基因的侧翼进行基因扩增,均出现明显的扩增失败迹象,仅在 PROP1 基因的侧翼的远端出现微量扩增,与正常人体的 PROP1 基因以及 PROP1 基因的侧翼进行对比后发现,正是由于 SHGC-147122STS 和 Q6ZTH3EXON1 基因片段之间的 SQ1、SQ2、SQ3、SQ4、SQ5、SQ6、SQ7 基因的缺失,造成患者的 DNA 转录发生变化,最终造成患者的疾病的发生,而从分子水平分析,由于患者的 SHGC-147122STS 和 Q6ZTH3EXON1 基因片段之间的 SQ1、SQ2、SQ3、SQ4、SQ5、SQ6、SQ7 基因的变化,造成患者 53kb 基因缺失,最终形成基因扩增片段的终止,破坏正常人体核酸物质的完整性,国外有研究报道显示^[14],在 SHGC-147122STS 和 Q6ZTH3EXON1 基因片段之间的基因中可能存在 ALU 重复基因,此类基因可以帮助人体对于扩增失败的基因进行删除,而在本研究中,通过对 3 例患者的进行扩增都出现了该片段基因的不完整性扩增,提示可能与文献报道 SHGC-147122STS 和 Q6ZTH3EXON1 基因片段之间的 ALU 重复基因相关。

综上所述,PROP1 基因以及 PROP1 基因的侧翼突变均为垂体激素分泌缺陷的重要核酸基础,本研究通过对 2 个无血缘关系的家庭中的 3 例患者进行金银扩增中发现,其 PROP1 基因的 3 个特异性外显子均发现缺失性突变,同时在对 PROP1 基因的侧翼进行扩增过程中发现,患者出现非连续性基因片段扩增,提示 3 例患者均存在 PROP1 基因以及 PROP1 基因的侧翼突变,其缺失大小为 53 kb。

参考文献:

- [1]程世奇,范恒怡,祝新根,等.多亮氨酸重复区免疫球蛋白样蛋白 1 基因表达对外分泌垂体瘤细胞株 RC-4B/C 生物学功能的影响[J].中华实验外科杂志,2016,33(2):392-396.
- [2]姜宇,周仁华,曾水林,等.垂体同源盒家族因子 3 和孤儿核受体相关因子 1 基因在帕金森病模型大鼠腹侧中脑表达显著下调[J].神经解剖学杂志,2016,32(2):257-261.
- [3]滕晓春,金婷,王冉冉,等.一例 TRβ 基因 P453T 突变所致的甲状腺激素抵抗综合征合并垂体 TSH 微腺瘤的病例报告[J].中华内分泌代谢杂志,2016,32(1):19-23.
- [4]王翼.2 个家系的 PROP1 基因缺失研究[D].上海交通大学,2008.
- [5]衡文娜,郭春华,张晓晖,等.PROP1 与联合垂体激素缺乏症[J].生物学杂志,2007,24(2):1-4.
- [6]韩白玉,李乐乐,王成芷,等.垂体柄中断综合征与前动力蛋白受体 2 和前动力蛋白 2 基因突变的相关性分析[J].中国医学科学院学报,2016,38(1):37-41.
- [7]Osorio MG,Kopp P,Marui S,et al.Combined pituitary hormone deficiency caused by a novel mutation of a highly conserved residue (F88S) in the homeodomain of PROP-1[J].Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism,2000,85 (8):2779-2785.
- [8]Birla S,Khadgawat R,Jyotsna V,et al.Identification of Novel PROP1 and POU1F1 Mutations in Patients with Combined Pituitary Hormone Deficiency [J].Hormone & Metabolic Research,2016,48(12):822-827.
- [9]Ziemnicka K,Budny B,Drobnik K,et al.Two coexisting heterozygous frameshift mutations in PROP1 are responsible for a different phenotype of combined pituitary hormone deficiency [J].Journal of Applied Genetics,2016,57(3):373-381.
- [10]Dusatkova P,Pfiffle R,Brown MR,et al.Genesis of two most prevalent PROP1 gene variants causing combined pituitary hormone deficiency in 21 populations [J].European Journal of Human Genetics Ejhg,2016,24(3):415.
- [11]Chaudhary DP,Rijal T,Jha KK,et al.PROP1 gene mutations in a 36-year-old female presenting with psychosis[J].Endocrinol Diabetes Metab Case Rep,2017,2017(1):16-96.
- [12]Madeira JL,Nishi MY,Nakaguma M,et al.Molecular analysis of brazilian patients with combined pituitary hormone deficiency and orthotopic posterior pituitary lobe reveals eight different PROP1 alterations with three novel mutations [J].Clinical Endocrinology,2017,87(6):725-732.
- [13]Giordano M.Genetic causes of isolated and combined pituitary hormone deficiency [J].Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism,2016,30(6):679.
- [14]Rienzo FD,Mellone S,Bellone S,et al.Frequency of genetic defects in Combined Pituitary Hormone Deficiency: a systematic review and analysis of a multicentre Italian cohort [J].Clinical Endocrinology,2016,83(6):849-860.

收稿日期:2018-11-21;修回日期:2018-12-25

编辑/钱洪飞