

- CA Cancer J Clin, 2017, 67 (1): 7-30.
- [2] Comp  rat E, Larr   S, Roupret M, et al. Clinicopathological characteristics of urothelial bladder cancer in patients less than 40 years old [J]. Virchows Arch, 2015, 466 (5): 589-594.
- [3] Hall M C, Chang S S, Dalbagni G, et al. Guidelines for the management of nonmuscle invasive bladder cancer (stages Ta, T1, and Tis): 2007 update [J]. J Urol, 2007, 178 (6): 2314-2330.
- [4] Persad R, Lamm D, Brausi M, et al. Current approaches to the management of non-muscle invasive bladder cancer: comparison of current guidelines and recommendations [J]. Eur Urol, suppl, 2008, 7 (10): 637-650.
- [5] Ukai R, Hashimoto K, Iwasa T, et al. Transurethral resection in one piece (TURBO) is an accurate tool for pathological staging of bladder tumor [J]. Int J Urol, 2010, 17 (8): 708-714.
- [6] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68 (6): 394-424.
- [7] Babjuk M, Oosterlinck W, Sylvester R, et al. EAU Guidelines on non-muscle-invasive urothelial carcinoma of the bladder, the 2011 update [J]. Eur Urol, 2011, 59 (6): 997-1008.
- [8] Maruniak N A, Takezawa K, Murphy W M. Accurate pathological staging of urothelial neoplasms requires better cystoscopic sampling [J]. J Urol, 2002, 167 (6): 2404-2407.
- [9] Richterstetter M, Wullich B, Amann K, et al. The value of extended transurethral resection of bladder tumour (TURBT) in the treatment of bladder cancer [J]. BJU Int, 2012, 110 (2 Pt 2): E76-79.
- [10] Mariappan P, Zachou A, Grigor K M, et al. Detrusor muscle in the first, apparently complete transurethral resection of bladder tumour specimen is a surrogate marker of resection quality, predicts risk of early recurrence, and is dependent on operator experience [J]. Eur Urol, 2010, 57 (5): 843-849.
- [11] Kawada T, Ebihara K, Suzuki T, et al. A new technique for transurethral resection of bladder tumors: rotational tumor resection using a new arched electrode [J]. J Urol, 1997, 157 (6): 2225-2226.
- [12] Ukai R, Kawashita E, Ikeda H. A new technique for transurethral resection of superficial bladder in 1 piece [J]. J Urol, 2000, 163 (3): 878-879.
- [13] Yang Y, Wei Z, Zhang X, et al. Transurethral partial cystectomy with continuous wave laser for bladder carcinoma [J]. J Urol, 2011, 182 (1): 66-69.
- [14] 韩聪祥, 黄美霞. 一种组合式经尿道手术用腔镜: 2017-20270434.2 [P]. 2018-04-13.

## • 临床研究 •

# 21-羟化酶缺乏症患者 20 例临床表型和基因突变分析

福建省立医院内分泌科 (福州 350001) 路荣梅 李锦新 梁继兴 陈 刚 温俊平<sup>1</sup>

**【摘 要】** 目的 分析 20 例 21-羟化酶缺乏症 (21-OHD) 患者细胞色素 P450c21 (CYP21A2) 基因型与临床表型的关系。方法 该项研究以 2014—2019 年就诊于福建省立医院的 20 例 21-OHD 患者以及部分患者家属为研究对象, 经我院伦理委员会批准, 在获得患者及其家属知情同意后提取其外周血基因组 DNA, 采用聚合酶链式反应 (PCR), 分两段扩增 CYP21A2 的全长, 通过产物直接测序来确定患者的基因型。结果 20 例患者共检出 12 种突变, 其中 8 种致病突变, 4 种单核苷酸多态性突变。8 种致病突变中占比较高的分别是 p. I173N (55.6%) 和 IVS2-13A/C>G (27.8%)。同时还发现一种较罕见的突变位点 R150P 和一种新的复合纯合突变致病类型 p. R484P+Arg484fs/R484P+Argfs。结论 PCR 产物直接测序法能特异地测出 CYP21A2 的突变位点, 通过与临床生化检测结果相结合可以为 21-OHD 的诊断提供更加确切的依据, 便于其后续的疾病治疗和遗传咨询。

**【关键词】** 21-羟化酶缺乏症; CYP21A2; 单核苷酸多态性

**【中图分类号】** R586 **【文献标识码】** B **【文章编号】** 1002-2600(2021)01-0010-05

**Analysis of clinical symptoms and gene mutations in 20 patients with 21-hydroxylase deficiency** LU Rongmei, LI Jinxin, LIANG Jixing, CHEN Gang, WEN Junping. Department of Endocrinology, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou, Fujian 350001, China

**【Abstract】 Objective** To analyze the relationship between CYP21A2 genotype and clinical phenotype in 20 patients with

<sup>1</sup> 通信作者: Email: junpingwen@163.com

21-hydroxylase deficiency. **Methods** After approved by ethics committee of our hospital, the genomic DNA was extracted from the peripheral blood sample of 20 patients with 21-OHD, who were treated in department of endocrinology, Fujian Provincial Hospital between 2014 and 2019, and parts of their parents after obtaining the informed consent. All the 10 exons of CYP21A2 gene were amplified by PCR and directly sequenced to detect disease-causing mutations. **Results** Twelve kinds of mutations in CYP21A2 gene were found in this study. Eight of them were disease-causing mutations, and the rest were SNP. A relatively high proportion of the eight disease-causing mutations were p. I173N (55.6%) and IVS2-13A/C>G (27.8%). Meanwhile, a relatively rare mutation site R150P and a new compound homozygous pathogenic mutations p. R484P+Arg484fs/R484P+Argfs were found in this study. **Conclusion** The method in this study based on the direct sequencing can identify the mutations of CYP21A2 gene with high specificity. Directly sequenced combine with the clinical biochemical test results can provide more accurate evidence for the diagnosis of 21-hydroxylase deficiency.

**【Key words】** 21-hydroxylase deficiency; CYP21A2; single nucleotide polymorphism

先天性肾上腺皮质增生 (congenital adrenal hyperplasia, CAH) 是一类以糖皮质激素和盐皮质激素减少、促肾上腺皮质激素 (adrenocorticotrophic hormone, ACTH) 和雄激素分泌增多为特征的常染色体隐性遗传病<sup>[1]</sup>。其中最常见的类型是编码 21-羟化酶的 CYP21A2 基因突变所致的 21-羟化酶缺乏症 (21-hydroxylase deficiency, 21-OHD), 占 CAH 的 95%<sup>[2-3]</sup>。根据 21-羟化酶剩余酶活性的多少, 该病可分为经典型 (失盐型和单纯男性化型) 和非经典型。21-OHD 致病基因 CYP21A2 位于 6p21.3, 该基因改变导致 21-OHD 疾病发生的主要机制是基因的大片段缺失和基因转换, 其中基因转换占比 90%。迄今为止, 已有超过 1 300 种突变位点被报道, 但是功能验证后确定与 21-OHD 相关的只有 230 种<sup>[4]</sup>。故中华儿科杂志 2016 年发表的《先天性肾上腺皮质增生症 21-羟化酶缺陷诊治共识》中提出对临床上不能确诊 21-OHD 或需要与其他相关疾病鉴别时, 必须做基因诊断确诊<sup>[5]</sup>。该项研究旨在分析患者临床表型和基因型之间的关系, 为 21-OHD 的治疗和预后提供一定的参考价值。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料:** 选择 2014 年 1 月至 2019 年 12 月就诊我科的 20 例 21-OHD 患者及其部分家属为研究对象。除 11 号患者父母属于近亲结婚外, 余均否认近亲婚配史。男 (染色体性别) 6 例, 女 (染色体性别) 14 例。就诊原因多数为生殖器畸形、生长发育缓慢、不孕不育等, 临床检查结果均显示促肾上腺皮质激素、睾酮、17 $\alpha$ -羟孕酮水平增高, 双肾上腺 B 超显示肾上腺增生, 临床诊断 21-OHD, 诊断符合 21-羟化酶缺乏症诊疗指南 (2019 年版)。本研究经我院伦理委员会批准, 获得患者及其家属知情同意。

## 1.2 方法:

**1.2.1 基因组提取:** 采用 EDTA 抗凝管采集患者及其家属外周血。按照北京天根基因组提取试剂盒 (TIANamp Blood Kit) 说明书提取患者基因组。

**1.2.2 CYP21A2 引物设计、PCR 扩增和测序结果比对:** 参考张惠杰<sup>[6]</sup>文献报道的方法, 使用的引物和程序进行 PCR, 产物电泳结果见图 1, 测序公司选择福州博尚生物技术有限公司。测序结果选用 DNAssist 2.2 软件进行比对分析。

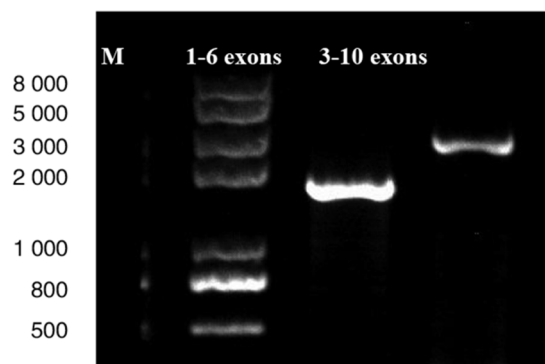


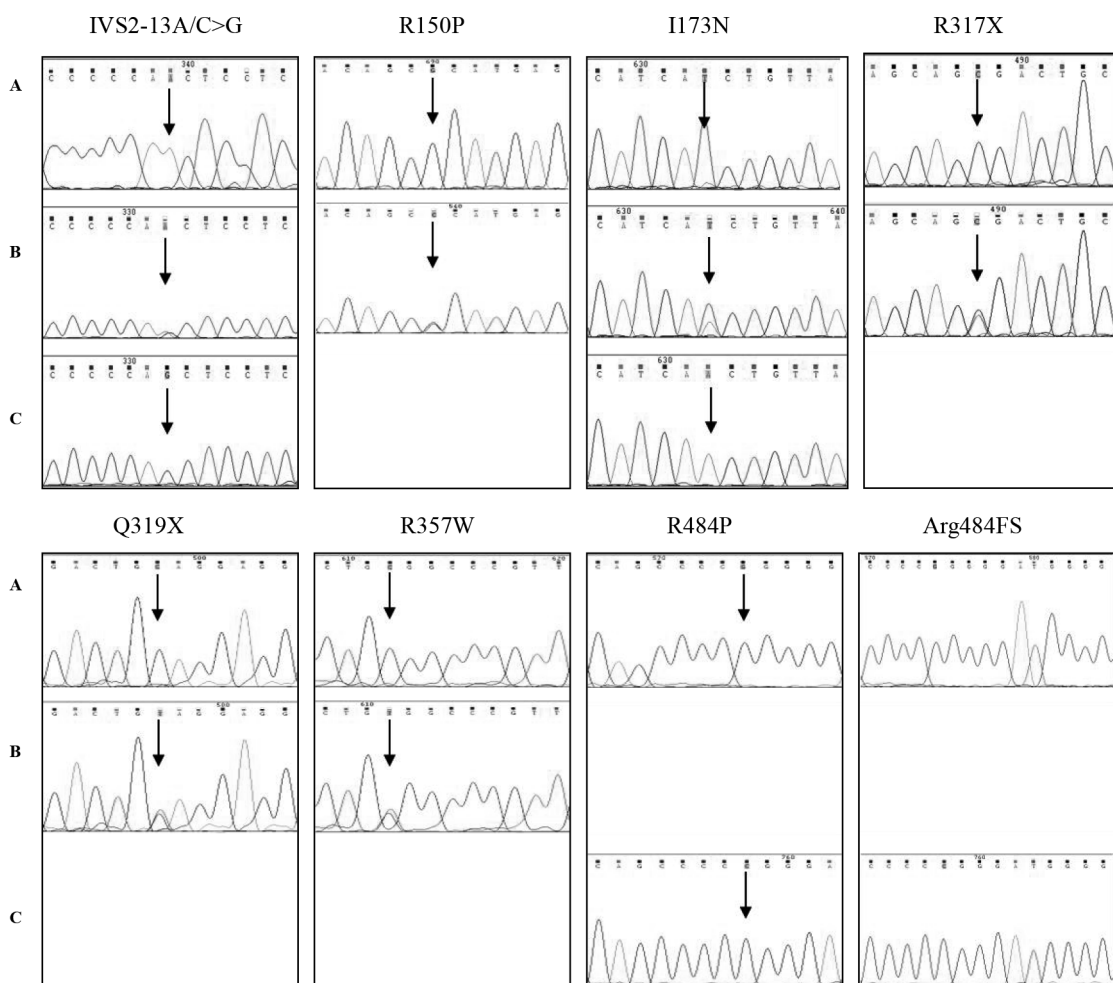
图 1 PCR 扩增产物电泳图

## 2 结果

该项研究共检出 12 种突变: 其中 8 种致病突变和 4 种单核苷酸多态性突变。8 种致病突变分别是: IVS2-13A/C>G、p. R150P、p. I173N、p. R317X、p. Q319X、p. R357W、p. R484P、Arg484FS; 4 种单核苷酸多态性突变分别是: 139\_141del CTG、p. R103K、p. S269T、p. S494N。其中 R150P 是中国人中较为罕见的突变位点。除此之外, 该项研究还发现一种新的复合纯合突变致病类型 p. R484P+Arg484fs/R484P+Argfs。20 例患者临床分型、CYP21A2 基因检测结果和一代测序结果峰图见表 1 和图 2。

表 1 20 例 21-OHD 患者临床表型和 CYP21A2 基因检测结果

编号	年龄	性别	临床表型	基因型	父亲基因型	母亲基因型
1	5	女	女性男性化	IVS2-13A/C>G/R317X	R317X/-	IVS2-13A/C>G/ IVS2-13A/C>G
2	22	女	女性男性化	IVS2-13A/C>G/I173N	不参加	不参加
3	23	女	女性男性化	I173N/I173N	不参加	不参加
4	5	男	男性性早熟	IVS2-13A/C>G/IVS2-13A/C>G	不参加	不参加
5	27	男	失盐型	IVS2-13A/C>G/IVS2-13A/C>G	不参加	不参加
6	12	男	男性性早熟	R484P + Arg484FS/R484P + Arg484FS	不参加	不参加
7	23	女	女性男性化	IVS2-13A/C>G/I173N	I173N/-	IVS2-13A/C>G/-
8	10	女	女性男性化	IVS2-13A/C>G/I173N	I173N/-	IVS2-13A/C>G/-
9	7	男	男性性早熟	I173N/Q319X+R357W	I173N/-	Q319X/ R357W/-
10	14	女	女性男性化	I173N/I173N	不参加	不参加
11	6	女	女性男性化	R150P/I173N	不参加	不参加
12	27	男	男性性早熟	I173N/I173N	不参加	不参加
13	2	女	女性男性化	I173N/I173N	I173N/-	I173N/-
14	7	女	女性男性化	I173N/I173N	I173N/-	I173N/-
15	6	女	女性男性化	IVS2-13A/C>G/I173N	IVS2-13A/C>G/-	I173N/-
16	48	男	男性性早熟	I173N/I173N	不参加	不参加
17	62	女	女性男性化	I173N/I173N	不参加	不参加
18	29	女	女性男性化	IVS2-13A/C>G/I173N	不参加	不参加
19	35	女	女性男性化	I173N/I173N	I173N/-	I173N/-
20	29	女	女性男性化	I173N/I173N	不参加	不参加



注：A，野生型；B，杂合型；C，纯合型。

图 2 致病突变测序图谱汇总

典型病例：5 号患者和 15 号患者在就诊我科前曾有误诊经历，经历了不适当的治疗，甚至曾经危及生命。

5 号患者，男，27 岁。以“生长迟缓 26 年，‘左侧肾上腺腺瘤’术后 1 年”为主诉入院。患者 26 岁时于外院行“左侧肾上腺切除术”，术后病理示：左侧肾上腺肿瘤，术后 3 天出现发热，最高 42℃，危及生命，治疗后体温降至正常。入院我科后检查结果显示：右侧肾上腺明显增粗，考虑肾上腺增生？肿瘤性病待排除。促肾上腺皮质激素 (ACTH) > 2 000 Pg/mL (正常参考值：7.20 ~ 63.60 Pg/mL) 17-羟孕酮 (17-OHP) > 25 ng/mL (正常参考值：0.31 ~ 2.01 ng/mL)，结合其他检查，该患者拟诊为 21-OHD，后行 CYP21A2 基因突变检测，通过临床检查异常结果结合基因诊断结果，证实该患者为 21-OHD。

15 号患者，6 岁，社会性别男性。出生后发现双侧阴囊内无睾丸，尿道口下裂。当地医院染色体核型分析显示 46, XY。3 岁来我院小儿外科行“腹腔镜探查+双睾丸下降固定术”，术中探查见子宫、双侧输尿管及卵巢样组织存在，未探及睾丸样组织，考虑女性两性畸形。6 岁患者就诊我科，复查染色体核型示 46, XX，促肾上腺皮质激素 (ACTH) = 1 078 Pg/mL (正常参考值：7.20 ~ 63.60 Pg/mL)，睾酮 (T) = 13.55 nmol/L (正常参考值：女，0.35 ~ 3.12 ng/mL)，孕酮 (PROG) = 29.81 ng/mL (正常参考值：0.10 ~ 0.84 ng/mL)，结合其他检查，该患者拟诊为 21-OHD，后行 CYP21A2 基因突变检测，通过临床检查结果结合基因诊断结果，证实该患者为 21-OHD。

### 3 讨论

21-OHD 是一种常染色体隐性遗传的罕见病，已有研究证实，21-OHD 致病基因 CYP21A2 的突变大部分来自于真假基因间的基因转化，本研究中发现的 8 种致病突变中 50% 来源于真假基因间的基因转化。文献报道，在假基因来源的突变中，p. P30L, p. V281L 通常表型为非经典型；p. G110fs, p. I173N, p. I236N、p. V237E 和 p. M239K, p. L307fs, p. Q319X 和 p. R357W, IVS2-13A/C>G 通常表现为经典型<sup>[7-8]</sup>，其中 IVS2-13A/C>G、p. Q319X、p. R357W 突变使酶的活性几乎完全丧失，因而这几种突变常与经典型中的失盐型相关<sup>[9]</sup>；p. I173N 突变仍然可以保持 2% ~ 11% 的酶活性，故此类突变常与经典型中的单纯男性化型相

关。Hou 等<sup>[10]</sup>发现，在经典型 SW 和 SV 患者中，基因型和表型之间有着很好的相关性。然而，也有其他报道称该病的临床表型和基因型之间没有关联。本研究也发现了类似的情况，尽管 4 号和 5 号患者的基因型均为 IVS2-13A/C>G 纯合突变，但 4 号临床表型为男性假性性早熟，5 号临床表型为失盐型，由于两者发病年龄有明显差异，不能排除 4 号患者失盐表型为迟发型。除此之外，2 号、7 号、15 号和 18 号患者，虽然都是 IVS2-13A/C>G 携带者，但临床表型均为单纯男性化型，产生这种现象的原因可能是等位基因上突变相较不严重的突变类型决定了该患者的临床表型，即复合杂合突变的严重程度主要取决于损害酶活性较轻的突变<sup>[11]</sup>，而这 4 例患者另一个突变均为 I173N，故最终表现为单纯男性化型。除此之外，该项研究还发现：1) 1 号患者的突变类型是复合杂合致病突变：IVS2-13A/C>G/R317X，其中 R317X 来自于父亲，IVS2-13A/C>G 来自于母亲，但母亲的测序结果显示 IVS2-13A/C>G/IVS2-13A/C>G 纯合突变，从以往的文献分析可以看出 IVS2-13A/C>G 纯合突变会导致 21-羟化酶活性丧失，患者出现失盐的表现，但 1 号患者的母亲实验室的各项检查结果均没有太大的问题，并且在没有经过治疗的情况下成功怀孕，究其原因我们推测可能是由于基因的修饰或者是表观遗传学的影响<sup>[12-13]</sup>，具体还需后续实验的验证；2) 6 号患者的突变类型是一种新型复合纯合致病突变：R484P + Arg484FS/ R484P + Arg484FS，即 484 位的氨基酸由精氨酸变成脯氨酸，并且后续碱基 G 的纯合缺失导致氨基酸发生移码突变，最终使得蛋白质提前终止；3) 9 号患者测序结果出现 3 种杂合突变的复合致病类型：I173N/Q319X+R357W，其中 I173N 来自于父亲，Q319X+R357W 来自与母亲，分析发现 Q319X+R357W 均正常存在于 21 羟化酶的假基因 CYP21A1P 上，考虑可能是其母亲 CYP21A2 基因发生大的基因转换或多重突变事件造成<sup>[14]</sup>。9 号患者的母亲虽然是复合杂合突变，但是两个突变位点均来源于同一条染色体，另一条染色体上的 CYP21A2 基因可以正常地表达，故并未致病。

随着科学技术的迅猛发展，全外显子测序的出现凭借其检测深度大，检测范围广等优势，为临床罕见病、疑难疾病、复杂疾病，特别是孟德尔遗传病的诊断提供了有效的方法。但对于本研究涉及的疾病——21-OHD 而言，由于其致病基因



(CYP21A2) 存在一个与其基因序列同源性高达 95% 的假基因 (CYP21A1P), 且致病基因改变导致疾病发生的主要机制是真假基因间的基因转换 (占比 90%), 故全外显子测序对于该病的检测并不适用。尽管一代测序有其自身的局限性, 但对于本病的检测而言, 我们可以通过在真假基因差异序列位置 (第 3、6 外显子) 巧妙地设计特殊引物, 以此来保证扩增过程只扩增致病基因, 从而排除假基因对于该病诊断的干扰。虽然该病目前还不能够完全治愈, 但其有确定的药物治疗方案。2010 年 Endocrine Society Clinical Guidelines Subcommittee 专家制定, 并发布了 21-OHD 临床实践指南。作为一种遗传病, 该病是可以进行产前诊断的, 21-OHD 的产前诊断是建立在临床背景的基础上, 通过生化测定和遗传诊断确定。同时, 该病还有不同于其他遗传病的另一个特点, 那就是可以进行产前治疗。研究表明, 宫内治疗对女性患儿治疗有效率可达 85%, 可以显著减轻或消除新生儿外生殖器畸形症状。所以该病应尽早确诊及规范治疗, 使患者可以避免发生失盐危象, 减少病死率; 避免骨龄老化, 改善终身高; 避免成年后生育功能障碍等。

#### 参考文献

- [1] Goncalves J, Friaes A, Moura L. Congenital adrenal hyperplasia: focus on the molecular basis of 21-hydroxylase deficiency [J]. *Expert Rev Mol Med*, 2007, 9 (11): 1-23.
- [2] White P C, Speiser P W. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency [J]. *Endocr Rev*, 2000, 21 (3): 245-291.
- [3] El-Maouche D, Arlt W, Merke D P. Congenital adrenal hyperplasia [J]. *Lancet*, 2017, 390 (10108): 2194-2210.
- [4] Simonetti L, Bruque C D, Fernandez C S, et al. CYP21A2 mutation update: Comprehensive analysis of databases and published genetic variants [J]. *Hum Mutat*, 2018, 39 (1): 5-22.
- [5] 中华医学会儿科学分会内分泌遗传代谢病学组. 先天性肾上腺皮质增生症 21-羟化酶缺陷诊治共识 [J]. *中华儿科杂志*, 2016, 54 (8): 569-576.
- [6] 张惠杰. 21 羟化酶缺乏症的临床与分子遗传学研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2008: 1-80.
- [7] Haider S, Islam B, D'Atri V, et al. Structure-phenotype correlations of human CYP21A2 mutations in congenital adrenal hyperplasia [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110 (7): 2605-2610.
- [8] New M I, Abraham M, Gonzalez B, et al. Genotype-phenotype correlation in 1, 507 families with congenital adrenalhyperplasia owing to 21-hydroxylase deficiency [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110 (7): 2611-2616.
- [9] Choi J H, Jin H Y, Lee B H, 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.
- [10] Hou L, Liang L, Lin S, et al. Analysis of phenotypes and genotypes in 84 patients with 21-Hydroxylase deficiency in southern China. *Steroids*, 2019, 151: 108474.
- [11] Mnif M F, Kamoun M, Kacem F H, et al. Reproductive outcomes of female patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency [J]. *Indian J Endocrinol Metab*, 2013, 17 (5): 790-793.
- [12] Ladd-Acosta C, Fallin M D. The role of epigenetics in genetic and environmental epidemiology [J]. *Epigenomics*, 2016, 8 (2): 271-283.
- [13] Cavalli G, Heard E. Advances in epigenetics link genetics to the environment and disease [J]. *Nature*, 2019, 571 (7766): 489-499.
- [14] Rabbani B, Mahdich N, Ashtian M T, et al. Mutation analysis of the CYP21A2 gene in the Iranian population [J]. *Genet Test Mol Biomarkers*, 2012, 16 (2): 82-89.

## • 临床研究 •

# 基于数据挖掘分析炭疽毒素受体 1 在胃癌中的表达及其意义

福建省立医院消化内镜中心 (福州 350001) 郑金辉 梁 玮 林晓露 黄正凌 王国伟 邓万银<sup>1</sup>

**【摘 要】 目的** 通过生物信息学的方法分析炭疽毒素受体 1 (ANTXR1) 在胃癌中表达及意义, 揭示相应的分子机制。**方法** 检索多个公共数据库中有关 ANTXR1 表达和临床数据, 分析 ANTXR1 在胃癌中表达情况及其与包括预后在内的临床病理特征的关系, 并下载 ANTXR1 的共表达基因, 通过基因本体 (GO) 富集和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路分析预测 ANTXR1 参与的生物学过程。**结果** ANTXR1 在胃癌组织中的表达异常上调, 其表达与胃癌患者的 T 分期、