

# 21 羟化酶缺陷导致的先天性肾上腺皮质增生症的实验室诊断共识

中华医学会儿科分会罕见病学组

中国医师协会医学遗传医师分会

中国妇幼保健协会出生缺陷防治与分子遗传分会

上海市医学会分子诊断专科分会

执笔:孙昱<sup>1,2</sup> 邱玲仟<sup>3</sup> 叶蕾<sup>4</sup> 邱文娟<sup>1,2</sup> 余永国<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>上海交通大学医学院附属新华医院儿内分泌/遗传科,上海 200092; <sup>2</sup>上海市儿科医学研究所,上海 200092; <sup>3</sup>中南大学生命科学学院医学遗传学研究中心,长沙 410006; <sup>4</sup>上海交通大学医学院附属瑞金医院内分泌科,上海 200025

通信作者:余永国,Email:yuyongguo@shsmu.edu.cn;

邱文娟,Email:qiuwenjuan@xinhumed.com.cn

**【摘要】** 21 羟化酶缺陷(21-OHD)是由于编码参与糖皮质激素和盐皮质激素合成的细胞色素 P450 氧化酶(P450C21)的CYP21A2 基因缺陷导致的遗传病,是先天性肾上腺皮质增生症最常见的类型,其确诊需结合临床表现、实验室生化指标和分子遗传学检测的结果综合判断。由于CYP21A2 结构复杂,对其进行基因诊断需采用特殊的检测方法以排除假基因的干扰。近年来,21-OHD 的类固醇激素谱生化检测技术和三代测序分子诊断技术逐渐得到推广。为进一步规范 21-OHD 的实验室诊断,由中华医学会儿科分会罕见病学组、中国医师协会医学遗传医师分会、中国妇幼保健协会分子遗传专委会及上海市医学会分子诊断专科分会组织专家进行讨论,并参考国内外的最新研究进展和共识指南,就 21-OHD 的实验室诊断规范制定本共识。

**【关键词】** 21 羟化酶缺陷;先天性肾上腺皮质增生症;CYP21A2 基因;共识

**基金项目:** 基金项目:国家重点研发计划(2022YFC2703400、2019YFC1005100);上海交通大学医学院儿科学院肾上腺皮质功能不全临床研究中心(ELYZX202106)

DOI:10.3760/cma.j.cn511374-20230330-00178

## Consensus on the laboratory diagnosis of congenital adrenal hyperplasia due to 21 hydroxylase deficiency

Rare Diseases Group, Pediatric Branch of Chinese Medical Association

Medical Geneticists Branch of Chinese Medical Doctor Association

Birth Defect Prevention and Molecular Genetics Branch of China Maternal and Child Health Care Association

Molecular Diagnosis Branch of Shanghai Medical Association

Sun Yu<sup>1,2</sup>, Wu Lingqian<sup>3</sup>, Ye Lei<sup>4</sup>, Qiu Wenjuan<sup>1,2</sup>, Yu Yongguo<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatric Endocrinology/Genetics, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China; <sup>2</sup>Shanghai Institute for Pediatric Research, Shanghai 200092, China; <sup>3</sup>Medical Genetics Research Center, School of Life Sciences, Central South University, Changsha, Hunan 410006, China; <sup>4</sup>Department of Endocrinology, Ruijin Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China

Corresponding authors: Yu Yongguo, Email: yuyongguo@shsmu.edu.cn

Qiu Wenjuan, Email: qiuwenjuan@xinhumed.com.cn

**【Abstract】** 21 hydroxylase deficiency (21-OHD), the most common form of congenital adrenal hyperplasia, is caused by defects in CYP21A2 gene, which encodes the cytochrome P450 oxidase (P450C21) involved in glucocorticoid and mineralocorticoid synthesis. The diagnosis of 21-OHD is based on the comprehensive evaluation of clinical manifestation, biochemical alteration and molecular genetics results.

Due to the complex structure of *CYP21A2*, special techniques are required to perform delicate analysis to avoid the interference of its pseudogene. Recently, the state-of-the-art diagnostic methods were applied to the clinic gradually, including the steroid hormone profiling and third generation sequencing. To standardize the laboratory diagnosis of 21-OHD, this consensus was drafted on the basis of the extensive knowledge, the updated progress and the published consensus and guidelines worldwide by expert discussion organized by Rare Diseases Group of Pediatric Branch of Chinese Medical Association, Medical Genetics Branch of Chinese Medical Doctor Association, Birth Defect Prevention and Molecular Genetics Branch of China Maternal and Child Health Association, and Molecular Diagnosis Branch of Shanghai Medical Association.

**【Key words】** 21 hydroxylase deficiency; Congenital adrenal hyperplasia; *CYP21A2* gene; Consensus

**Fund program:** the National Key Research and Development Program of China (2022YFC2703400, 2019YFC1005100); Construction Project of Clinical Research Center for Adrenal Insufficiency, School of Pediatrics, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (ELYZX202106)

DOI: 10.3760/cma.j.cn511374-20230330-00178

先天性肾上腺皮质增生症 (congenital adrenal hyperplasia, CAH) 是一组由于编码肾上腺皮质类固醇生物合成酶的基因缺陷所导致的遗传病, 均呈常染色体隐性遗传, 其临床表现包括肾上腺皮质功能不全、电解质紊乱和/或性腺发育异常, 部分成人表现为月经紊乱、不孕不育等, 且常伴有双侧肾上腺皮质代偿性增生, 部分非经典成人患者可因意外发现的双侧肾上腺及睾丸残基瘤就诊<sup>[1]</sup>。

已知的 CAH 致病基因包括 *CYP21A2*、*CYP11B1*、*CYP17A1*、*HSD3B2*、*POR*、*STAR*、*CYP11A1* 和 *CYP11B2*<sup>[2-3]</sup>。其中以 21-羟化酶缺陷 (21-OHD) 所致的 CAH 最为常见, 占全部 CAH 的 95% 以上<sup>[4-5]</sup>。国内外报告的发病率为 1/20 000 ~ 1/10 000<sup>[6-7]</sup>。

21-OHD 与其他基因缺陷导致的 CAH 的临床症状存在一定的重叠, 单凭临床和生化指标无法可靠地鉴别, 而早期精准诊断对于治疗、预后及后续的遗传咨询至关重要。目前对 21-OHD 的诊断主要是基于 CAH 新生儿筛查结合临床表现、实验室生化检查和基因检测的结果进行综合判断<sup>[8]</sup>。近年来, 21-OHD 的类固醇激素谱生化检测技术和三代测序分子诊断技术逐渐进行临床应用。为进一步规范和优化 21-OHD 的实验室诊断方法和流程, 来自中华医学会儿科分会罕见病学组、中国医师协会医学遗传医师分会、中国妇幼保健协会分子遗传专委会及上海市医学会分子诊断专科分会的临床和实验室专家通过共同讨论, 达成了 21-OHD 所致 CAH 的实验室诊断的共识意见, 供国内同道参考。

## 1 21-OHD 实验室诊断的目的及适用人群

### 1.1 目的

明确 21-OHD 的诊断对及时治疗、改善预后及遗

传咨询至关重要。21-OHD 的实验室诊断包括生化诊断和基因诊断。对于出现以下表现的患者, 需要首先进行生化检查, 结合临床表现判定诊断的方向, 最终进行基因诊断。当两条等位基因均携带致病变异时, 可确诊为 21-OHD。

### 1.2 适用人群

对于有以下临床表现、怀疑为 21-OHD 者, 需通过相应的实验室检查进行确诊和鉴别诊断: ① 新生儿筛查发现 17 $\alpha$ -羟孕酮 (17 hydroxyprogesterone, 17 $\alpha$ -OHP) 升高; ② 有失盐和生长迟缓的表现; ③ 性早熟或性腺发育不良; ④ 儿童期提前生长加速, 骨龄超前, 预测成年终身高矮小; ⑤ ACTH 激发试验提示睾酮、17 $\alpha$ -OHP 和 21-脱氧皮质醇水平升高; ⑥ 女性有如下临床表现需考虑: a. 存在男性化特征, 尤其是阴蒂肥大、多毛症或痤疮者; b. 多囊卵巢综合征; c. 不孕、反复流产、月经周期异常; ⑦ 男性不育或肾上腺增生及睾丸残基瘤。

此外, 对存在以下临床需求的人群, 也建议进行 21-OHD 实验室诊断以辅助诊断及鉴别诊断: ① 21-OHD 患者的亲属和伴侣, 帮助确定其致病变异的携带情况; ② 有 21-OHD 先证者的家庭, 再次怀孕时建议行产前基因诊断。

## 2 21-OHD 的生化诊断

21-羟化酶是一种参与糖皮质激素和盐皮质激素合成的细胞色素 P450 氧化酶 (P450C21)<sup>[9]</sup>, 其缺乏可导致肾上腺皮质的束状带与球状带细胞的 21-羟化作用受损, 造成 17 $\alpha$ -OHP 和孕酮不能分别转化为 11-脱氧皮质醇和 11-脱氧皮质酮。皮质醇合成障碍反馈性促使垂体促肾上腺皮质激素 (adrenocorticotropin, ACTH) 分泌增加, 刺激肾上腺皮质增生, 导致 21-羟化酶的底物 17 $\alpha$ -OHP 等过度生成, 并经旁路代谢合成雄

烯二酮、辜酮和 21-脱氧皮质醇等肾上腺来源的雄激素<sup>[10-12]</sup>(图 1)。此外,在胎儿发育第 6 ~ 10 周和孕中期性分化的主要阶段,17 $\alpha$ -OHP 和孕酮可经旁路代谢和“后门”途径合成双氢辜酮<sup>[13-14]</sup>,造成胎儿期雄激素过剩,导致新生女婴外生殖器男性化(阴蒂肥大)和少数男婴阴茎增大。在出生后,由于糖皮质激素和盐皮质激素合成减少及肾上腺来源的雄激素水平升高,导致 21-OHD 相关的临床表现<sup>[15]</sup>。

21-OHD 主要分为经典型(classical)和非经典型(non-classical,NC)两种。经典型患者出生后可表现为肾上腺危象和 46,XX 患儿外生殖器男性化。经典型又进一步分为失盐型(salt wasting,SW)和单纯男性化型(simply virilizing,SV)。SW 型的 21-羟化酶活性完全缺乏(< 1%),占经典型的 75%。新生儿可能会出现危及生命的肾上腺危象,伴有严重的低钠血症和高钾血症。新生女婴还可出现外生殖器男性化(阴蒂肥大)。SV 型 21-羟化酶活性为正常人的 2% ~ 11%,主要表现为雄激素升高所致的女性男性化及男性性早熟,常无失盐症状<sup>[16]</sup>。NC 型的 21-羟化酶活性为正常人的 20% ~ 50%,具有较温和的表型,其临床表现通常在青春期或成年期出现,女性表型与多囊卵巢综合征重叠,男性表型更为隐匿<sup>[17]</sup>,亚洲国家的 NC 型发生率低于西方国家<sup>[18]</sup>。

## 2.1 CAH 的新生儿筛查

为早期识别和治疗 CAH、预防严重的并发症并降低死亡率,迄今国外已有 53 个国家及地区开展了 CAH 的新生儿筛查(newborn screening, NBS)<sup>[19]</sup>。由于 NC 型 21-OHD 新生儿期 17 $\alpha$ -OHP 升高不明显,存在漏筛的可能,目前 CAH 新生儿筛查的主要对象为经典型的 21-OHD 患儿。根据目前的筛查结果,经典型 CAH 的发病率为 1/18 000 ~ 1/14 000<sup>[20]</sup>。我国的 CAH 筛查起步于 20 世纪 90 年代初,目前多数省市已开展相关筛查,且逐渐从局部地区走向全面筛查。Li 等<sup>[21]</sup>对中国 785 万新生儿筛查荟萃分析显示经典型 CAH 的患病率为 1/23 024。

### 2.1.1 CAH 的新生儿筛查(常规流程)

对出生超过 48 h 的新生儿,按照 2019 版《新生儿疾病筛查滤纸片采集和递送及保存专家共识》采集足跟血于滤纸(Guthrie)片上<sup>[22]</sup>,测定其中 17 $\alpha$ -OHP 的浓度,并根据切值进行判断。由于 CAH 筛查的假阳性率较高,阳性预测值(positive predictive value, PPV)仅为 1.56% ~ 6.6%<sup>[23-25]</sup>,合理设定 17 $\alpha$ -OHP 的阳性切值是 CAH 新生儿筛查的关键。17 $\alpha$ -OHP 的检测方法有解离增强镧系元素荧光免疫分析法(dissociation-enhanced lanthanide fluoroimmunoassay, DELFIA)及液相色谱

串联质谱法(liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)<sup>[26]</sup>等,目前新生儿 CAH 筛查主要采用 DELFIA 法<sup>[27]</sup>。

17 $\alpha$ -OHP 检测的准确性受采血时间、胎龄、出生体重、检测方法等因素的影响,目前尚无统一的筛查切值标准。部分实验室根据胎龄和出生体重对 17 $\alpha$ -OHP 切值进行分层处理。由于 17 $\alpha$ -OHP 水平与胎龄的相关性高于出生体重,故根据胎龄设定切值可提高 NBS 的特异性<sup>[28]</sup>。17 $\alpha$ -OHP 水平的升高可能缘于免疫检测的交叉反应,在早产儿中也可能缘于其数种肾上腺类固醇合成酶功能尚不成熟。2010 年前,国际上普遍采用 AutoDELFI A 新生儿 17 $\alpha$ -OHP 试剂盒和 1235 AutoDELFI A<sup>®</sup>系统(芬兰 Perkin Elmer 公司)进行检测,之后使用新一代的新生儿 17 $\alpha$ -OHP 检测试剂盒(芬兰 Perkin Elmer 公司)和 GSP<sup>®</sup>系统(Genetic Screening Platform<sup>®</sup>, GSP<sup>®</sup>)测定 17 $\alpha$ -OHP。由于新一代试剂盒的配方变化和切值调整,使 CAH 筛查的阳性预测值从 0.4% 提高到 3.7%<sup>[25]</sup>。母亲孕期糖皮质激素类固醇激素的使用也可能导致新生儿的 17 $\alpha$ -OHP 水平降低,从而增加筛查假阴性的可能性,后续需多次随访检测<sup>[6]</sup>。

当新生儿初筛为阳性、即 17 $\alpha$ -OHP 水平高于切值时,需召回重新采血复查。若复查仍为阳性,需进行进一步的生化和基因诊断。目前国内多数筛查实验室多采用新生儿 17 $\alpha$ -OHP 检测试剂盒建议的阳性切值,部分实验室自行设定,缺乏统一标准。结合国内实验室经验,本共识推荐足月儿或正常体重儿( $\geq 2 500$  g)的 17 $\alpha$ -OHP 阳性切值为 15 nmol/L(GSP<sup>®</sup>新生儿 17 $\alpha$ -OHP 测定试剂盒),各筛查中心也可根据当地筛查统计资料、检测方法等进行调整,以提高筛查的敏感性与特异性。此外,国外有专家提出当初筛阳性患者 17 $\alpha$ -OHP 水平明显升高( $> 60$  nmol/L)时,可作为“阳性转诊”病例转给儿科内分泌专家及时评估和治疗<sup>[25]</sup>,以优化临床流程,保障危重患儿的健康。

### 2.1.2 CAH 的二级筛查

为保证 NBS 可筛查出所有的失盐型和多数的单纯男性化型患儿,目前的 17 $\alpha$ -OHP 切值水平设置通常较低,导致 NBS 的 PPV 仅为 1.56% ~ 6.6%<sup>[23-25]</sup>。为降低 NBS 的费用,以及尽可能减少筛查假阳性造成新生儿父母不必要的焦虑,近年研究发现采用 LC-MS/MS 进行原始干血斑的二级筛查可显著提高 CAH 筛查的 PPV,使其达到 25% ~ 70%<sup>[25,29-30]</sup>。

与 DELFIA 方法相比,LC-MS/MS 的优点主要体现在:首先,其类固醇激素检测的特异性和准确性均更好<sup>[31]</sup>;其次,LC-MS/MS 可通过一次检测同时测定更

多的类固醇激素代谢物或者分析代谢物的比值来提高筛查的敏感性和特异性<sup>[32]</sup>。例如,LC-MS/MS可同步检测17 $\alpha$ -OHP、21-脱氧皮质醇(21-DOF)、11-脱氧皮质醇、雄烯二酮(androstenedione, 4AD)、皮质醇(cortisol, F)的水平及分析计算(17 $\alpha$ -OHP + 4AD)/F、17 $\alpha$ -OHP/11-脱氧皮质醇<sup>[33]</sup>和(17 $\alpha$ -OHP + 21-DOF)/F比值等<sup>[34]</sup>。在21-羟化酶活性缺陷的情况下,大部分17 $\alpha$ -OHP被11 $\beta$ -羟化酶转化为21-DOF,即便在早产儿中也不会大量分泌21-DOF,因此,21-DOF水平升高对21-OHD具有高度的特异性<sup>[35-36]</sup>。有研究显示,通过分析(17 $\alpha$ -OHP + 4AD)/F的比值和21-DOF水平的二级筛查方案,可将筛查的PPV大幅提高至67%<sup>[30,37]</sup>。此外,17 $\alpha$ -OHP升高还可见于11 $\beta$ -OHD、PORD、3 $\beta$ -HSD以及17 $\alpha$ -OHD等其他类型的CAH,二级筛查通过同时检测多种类固醇激素,除可提高21-OHD新生儿筛查的效率外,还可以辅助这些疾病的诊断和鉴别诊断<sup>[38]</sup>。

## 2.2 21-OHD的生化实验室检查

对CAH新生儿筛查阳性或临床高度疑似的患者,检测其类固醇激素及其前体代谢物的水平是诊断CAH的主要手段。

**2.2.1 血标本采集** ACTH、皮质醇的分泌呈昼夜节律,早晨6点至8点达到峰值,午夜降至最低点<sup>[39]</sup>。因此建议在早晨8时前且在服用糖皮质激素前采血。对于成年女性,建议在月经周期的卵泡期清晨抽血。

**2.2.2 17 $\alpha$ -OHP** 17 $\alpha$ -OHP持续增高是诊断21-OHD的重要指标。建议至少在首次诊断时用LC-MS/MS法检测17 $\alpha$ -OHP。通常17 $\alpha$ -OHP浓度大于300 nmol/L提示经典型,6 ~ 300 nmol/L主要见于NC型<sup>[40]</sup>。小于6 nmol/L时基本可排除21-OHD。此外,17 $\alpha$ -OHP浓度超过30 nmol/L时可生化诊断21-OHD。

17 $\alpha$ -OHP基线浓度低于30 nmol/L、17 $\alpha$ -OHP基线水平不确定或已接受糖皮质激素治疗的患者,需进一步通过ACTH激发试验来明确诊断,静脉推注约250  $\mu$ g合成ACTH [1-24] (Cortrosyn),在基线和ACTH注射后30 min和/或60 min采血测定17 $\alpha$ -OHP和皮质醇的浓度。ACTH激发后17 $\alpha$ -OHP浓度若明显超过30 nmol/L提示可能为21-OHD(图2)。NC型患者的17 $\alpha$ -OHP可能正常。

**2.2.3 水电解质及酸碱平衡** SW型21-OHD患者可表现为低血钠、高血钾、代谢性酸中毒,SW及NC型电解质水平正常。

**2.2.4 血ACTH及皮质醇** 血ACTH多增高,伴或不伴皮质醇降低;NC型的皮质醇可正常。

**2.2.5 血雄烯二酮、孕酮** 21-OHD患者此类激素的水平有不同程度的增高。雄烯二酮影响因素较少,浓度相对较稳定,与17 $\alpha$ -OHP的水平有较好的相关性,但不如17 $\alpha$ -OHP敏感。21-OHD患者的孕酮水平有所升高<sup>[40]</sup>,但其诊断特异性不高<sup>[20]</sup>。

**2.2.6 血睾酮** 正常男性的睾酮主要由睾丸分泌,少量由肾上腺的雄烯二酮经17-羟类固醇转化而来。21-OHD患者的睾酮水平明显增高,但出生6个月内的男婴存在生理性的睾酮增高,应注意鉴别。

**2.2.7 血LC-MS/MS类固醇激素谱** 可一次性检测17 $\alpha$ -OHP、21-DOF、11-脱氧皮质醇、4AD、皮质醇、11-脱氧皮质酮、脱氢表雌酮、17-羟孕烯醇酮、睾酮的水平及计算(17 $\alpha$ -OHP + 4AD)/F比值等。Ye等<sup>[41]</sup>基于LC-MS/MS建立了13种循环类固醇激素的检测,并采用级联逻辑回归模型建立了用于CAH分类诊断的类固醇生成评分,其对21-OHD诊断的准确率与特异性均高于基线或ACTH刺激后的17 $\alpha$ -OHP。

**2.2.8 血肾素及醛固酮** 用于评估盐皮质激素的储备情况,但其血浓度受年龄、饮食中钠的摄入量、抽血时的体位及其他因素的影响,因此,其并非21-OHD的特异性诊断依据。正常新生儿及婴儿早期肾素及醛固酮可增高,缺乏诊断意义。SW及部分SV化型患者肾素水平可有不同程度的增高。部分患者虽有不同程度的醛固酮合成缺陷,导致醛固酮水平降低,但临床可无失盐症状。

**2.2.9 尿气相色谱质谱(GC-MS)类固醇激素谱** 可同时测定包括孕激素、糖皮质激素、盐皮质激素、雄激素的前体及代谢物以及雌激素,有助于21-OHD的诊断<sup>[42]</sup>,目前尚未纳入国内实验室的常规检测。

**2.2.10 染色体核型** 外生殖器性别模糊的患儿均需进行染色体检查以明确其遗传学性别。

## 3 21-OHD的基因诊断

在进行CYP21A2基因诊断前,应进行生化检查,结合临床表现和家族史情况,获得指向性的21-OHD诊断。进一步通过基因诊断来对21-OHD进行确诊。基因检测是21-OHD确诊的金标准。

### 3.1 21-OHD的致病基因CYP21A2

21-OHD是由CYP21A2基因的纯合或复合杂合致病变异所致<sup>[43]</sup>。CYP21A2基因编码21-羟化酶(P450C21),并有一个高度同源的假基因CYP21A1P<sup>[44]</sup>。真假基因外显子序列的同源性高达98%,内含子的同源性达96%,二者均定位于6p21.33区的HLA主要组织相容性复合体中。后者为一个高度可变的区域,两者分别与其邻近基因RP1/2

(*STK19/STK19B*)、*C4A/B* 和 *TNXA/B* 形成一个遗传单位 (RP-C4-CYP21-TNX, 称为 RCCX 模块)<sup>[45]</sup>。RCCX 模块在正常人中存在多种拷贝数变异, 其中最常见的是双 RCCX 模块, 约占高加索人群的 69%, 其次为单 RCCX 模块, 约占高加索人群的 17%, 此外还有功能正常的三模块和四模块的情况<sup>[46]</sup> (图 3)。

### 3.2 CYP21A2 基因的变异类型

*CYP21A2* 存在两种不同的转录本。推荐将 LRG\_829t1 (基于 NM\_000500.9) 作为其参考序列, 使用 HGVS 规则对发现的变异进行命名<sup>[47]</sup>。由于假基因与 *CYP21A2* 序列高度同源且位置相近, *CYP21A2* 的变异多来源于真假基因之间的重组 (图 3) 和/或微交换 (图 4), 新发变异的概率为 1% ~ 2%<sup>[20]</sup>。通过微交换产生的假基因变异包括错义、无义、剪接位点变异、小插入缺失 (indel), 包括 c.-126C>T、c.-113G>A、c.-110T>C、c.-103A>G、c.92C>T、c.293-13C/A>G、c.332\_339del、c.518T>A、E6 cluster (c.710T>A; c.713T>A; c.719T>A)、c.844G>T、c.923dup、c.955C>T 和 c.1069C>T 等。通过重组形成的大片段缺失则可能造成上述变异所在的外显子的缺失, 涉及第 1、3、4、6、7、8 外显子<sup>[48]</sup>。在中国人群中较常见的新发变异还包括失盐型变异 c.1451\_1452delinsC。

欧洲分子基因诊断质量联盟 (European Molecular Genetics Quality Network, EMQN) 发表的 21-OHD 分子诊断最佳实践详细整理了在高加索人中发现的变异, 并对其进行了致病性评估<sup>[49]</sup>, 可作为实验室基因诊断的参考。

对于文献中多次报道的致病变异以及在 ClinVar 等数据库中被归类为“致病”或“可能致病”的常见变异, 无需进一步评估其致病性。对于其他变异, 包括已被 ClinVar 数据库中收录但不太常见的变异, 须参照美国医学遗传学和基因组学学会 (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG)<sup>[50-51]</sup> 和英国临床分子遗传学协会 (Clinical Molecular Genetics Society, ACGS) 的变异致病性评估指南进行系统评估, 必要时可通过体外功能实验验证变异对 21 羟化酶活性的影响。

### 3.3 基因型-表型相关性

多数研究认为, 90% ~ 95% 的 21-OHD 患者的临床表型与其所携带的 *CYP21A2* 的变异存在相关性<sup>[52]</sup>。根据致病变异对蛋白酶活性的影响, 可将其分为严重型、中间型和轻型致病变异<sup>[53]</sup>。表 1 中列出了常见的具有不同影响的变异。

患者的 21 羟化酶残留活性取决于两条等位基因的综合影响。SW 型患者两条等位基因上的变异通常

均属于严重型; 25% ~ 50% 的 NC 型患者携带两条轻型变异, 其余 50% ~ 75% 携带一个轻型和一个严重型变异。基因型与表型的相关性在 SW 型患者中比较一致, 在 SV 型和 NC 型中逐渐降低<sup>[54-55]</sup>, 这可能与患者的其他调节类固醇代谢的基因背景相关。

重组所产生的真假融合基因, 可能体现为相应真基因的不同范围的缺失。不同的缺失导致的表型也有所差异: 大部分均为严重型变异, 而断裂点位于 c.293-13A/C>G 上游的第 1 ~ 2 外显子缺失的产物还会保留部分的酶活性, 为中间型变异<sup>[56]</sup>。因此需对断裂点进行检测, 以帮助预测表型。

基因型-表型不一致的一种可能原因是未对 *CYP21A2* 基因进行全面的变异检测, 即在此基因中可能还存在其他影响表型的变异。此外, 当缺失范围包含与 *CYP21A2* 毗邻的 *TNXB* 基因时, 会导致患者合并 Ehlers-Danos 综合征皮肤松弛的表型<sup>[57]</sup>。

### 3.4 基因诊断方法的介绍

**3.4.1 检测 *CYP21A2* 基因变异的推荐方法:** Sanger 测序+多重连接探针扩增 推荐采用特异性扩增结合 Sanger 测序以及多重连接探针扩增 (multiplex ligation-dependent probe amplification, MLPA) 的方法对整个 *CYP21A2* 基因进行全面的变异检测。

当患者检测出变异时, 需要对其父母进行溯源以明确致病变异是否分布在两条等位基因上。若无法获得父母的样本, 则需要借助家系中的其他成员来判断变异的顺反式。由于人群中 *CYP21A2* 致病性变异的携带率较高, 为防止漏检, 建议对基因型已知的高危亲属的 *CYP21A2* 基因进行全面的 Sanger 测序和 MLPA 分析, 而非仅检测患者携带的变异<sup>[58]</sup>。

70% ~ 80% 的病例可以通过 Sanger 测序检测出小的变异, 其余 20% ~ 30% 可以检测出缺失或重复<sup>[40]</sup>。此外, 由于 *CYP21A2* 基因的复杂性和技术局限性, 存在 Sanger 测序+MLPA 漏检的可能性。

**3.4.2 基于特异性 PCR 扩增的 Sanger 测序** 主要用于检测 SNV、小缺失/插入变异和 indel。通过选择性 PCR 引物特异性扩增 *CYP21A2*, 利用一个或多个长片段扩增覆盖该基因的全部外显子及内含子, 并用不同的测序引物对外显子及外显子/内含子边界进行 Sanger 测序。

由于真假基因同源性高, 特异性的引物往往设计在真假基因差异的位点上。当引物区域存在变异时, 会妨碍引物与模板 DNA 的结合, 继而发生等位基因脱扣 (allele dropout) 现象, 故需用不同的引物对片段进行扩增, 并结合 MLPA 的结果进行分析, 以避免等位基因扩增脱失造成的假阴性, 从而减少致病变异漏

表 1 常见的CYP21A2 变异-酶活性-表型对应表

变异类型	影响程度	残留酶活性(%)	表型	常见变异位点
小变异	严重型	0	失盐型	c.332_339del (p.Gly111Valfs * 21)
				E6 cluster (c.710T>A; c.713T>A; c.719T>A) (p.Ile237Asn; p.Val238Glu; p.Met240Lys)
				c.923dup (p.Leu308Phefs * 6)
				c.955C>T (p.Gln319 * )
				c.1069C>T (p.Arg357Trp)
				c.1451_1452delinsC (p.Arg484Profs * 58)
		<1	失盐型/ 单纯男性化型	c.293-13C/A>G (I2G)
中间型		2~11	单纯男性化型/ 失盐型	c.518T>A (p.Ile173Asn)
轻型		约 20~50	非经典型	c.-126C>T c.-113G>A c.-110T>C c.-103A>G c.92C>T (p.Pro31Leu) c.844G>T (p.Val282Leu)
大片段缺失	严重型	0	失盐型	E3 缺失 c.293-13C/A>G,c.332_339del
				E6 缺失 E6 cluster
				E7 缺失 c.844G>T,c.923dup
				E8 缺失 c.955C>T,c.1069C>T
中间型		2~11	单纯男性化型	E1 缺失 c.-126C>T,c.-113G>A,c.-110T>C,c.-103A>G,c.92C>T E4 缺失 c.518T>A

注：E1、E3、E4、E6、E7 和 E8 外显子缺失可以以组合的形式出现

检的情况<sup>[59]</sup>。可参照 EMQN 指南给出的引物。在进行 PCR 时需使用高保真的 Taq 聚合酶以避免引入假阳性<sup>[49]</sup>。

常规的测序仅能覆盖基因的外显子和内含子/外显子边界，而不包括启动子和 3'非翻译区。近年来，有研究者发现启动子和 3'非翻译区的变异可能影响疾病的发生和某些变异相关的表型，例如 c.-126C>T 和 c.-113G>A 可能影响CYP21A2 基因的转录<sup>[10]</sup>；c.\*13G>A 可能影响 RNA 的结构，降低 mRNA 的稳定性和表达水平<sup>[60]</sup>；c.[-126C>T,-113G>A]可能影响携带 p.Pro31Leu 变异者的表型。因此，可考虑将测序区域扩大到启动子上游和 3'UTR 区域，尤其是对于临床高度怀疑的 NC 型 21-OHD 而常规CYP21A2 检测未明确诊断的患者。

**3.4.3 MLPA** MLPA 技术针对真基因的特异位点设计探针，检测CYP21A2 基因外显子的拷贝数变异。目前商品化的CYP21A2 基因 MLPA 试剂盒主要来源于 MRC-Holland 公司，仅覆盖该基因的部分外显子。

由于CYP21A2 基因的复杂性和 MLPA 技术内在的局限性，临床在解释 MLPA 的结果时需对 21-OHD 和 CYP21A2 基因有深入的了解，有几点需要特别注意：

① 当只有一个探针的信号变化时，有可能是点变异所致；② 假基因CYP21A1P 可能会通过突变获得真基因上的碱基序列，从而影响对探针结果的判读；③ 探针结合区域存在其他非目标位点的变异时会影响探针的结合；④ 当基因重复和基因缺失同时存在时，MLPA 的结果可能显示为正常或难以解释。因此，MLPA 的结果需结合 Sanger 测序的结果进行判读。商品化的 CYP21A2-MLPA 试剂盒被全球实验室所广泛使用，该方法操作较为简单，且结果在实验室之间具有可比性。但由于探针的特异性和检测所覆盖的外显子不断更新，需在遗传报告中记录所使用的 MLPA 试剂盒的版本，以备数据解读之需。

**3.4.4 高通量测序** 基于高通量测序的 CAH 分子诊断方法包括靶向测序、外显子组测序及基因组测序等。靶向测序仅扩增或捕获多个 CAH 相关基因的重要区

域,并结合高通量测序(二代或三代测序)检测相关基因的致病变异。外显子组测序和全基因组测序则分别对 DNA 的编码区域和所有序列进行测序,之后针对 CAH 相关基因的序列进行分析,通过发现相应基因的致病变异实现对 CAH 的基因诊断和鉴别诊断。

二代测序技术可以实现短片段(通常小于 150 bp)的高通量测序,对序列特异性高的基因有较高的准确性。然而,对于 CYP21A2 基因而言,由于存在同源度极高的假基因,在分析数据时无法区分短片段的来源,导致二代测序结果不可靠。但二代测序技术对于非 21-OHD 的 CAH 病例有进一步鉴别诊断的作用<sup>[61]</sup>。

三代测序技术克服了二代测序读长短的劣势,测序最长读长超过 200 kb。其中 PacBio 测序平台可通过对原始单分子模板(可达 30 kb)进行多次测序,矫正单分子随机测序的错误,获得高准确性的一致性序列,再结合高深度测序(多个单分子模板)获得准确的变异信息。长片段多重 PCR 技术可以扩增 CYP21A2、CYP21A1P 以及真假基因同源重组形成的基因缺失、基因重复和大片段基因转换。三代测序可获得每个 PCR 扩增片段的完整序列,从而有效区分真假基因,并准确地鉴定出点变异、indel、缺失、重复和大片段基因转换<sup>[62-63]</sup>。利用三代测序进行 21-OHD 基因检测具有以下优势:① 利用同一反应体系同时检测 CYP21A2 基因所有类型的致病变异,包括复杂基因重复和大片段的基因转换;② 可以准确区分 CYP21A2 和 CYP21A1P,结果判读直观,不受真假基因同源性的干扰;③ 不依赖于家系基因型分析,可以直接分析两个和多个变异之间的顺反式关系。三代测序的技术优势使其在临床上有可能取代 Sanger 测序+MLPA 的方法。此外,三代测序还可以同时检测其他的 CAH 相关基因,一次性完成 CAH 的分子诊断和鉴别诊断。

各种基因诊断方法的原理、应用以及局限性总结在表 2 中。

**3.4.5 真假基因融合及断裂点的检测** 重组产生的 CYP21A1P/CYP21A2 融合基因将表现为真基因部分外显子的缺失,可通过 Sanger 测序和 MLPA 的方法进行检测,体现为序列上存在多个顺式分布的小变异以及 MLPA 在相应的外显子上的缺失。此外,三代测序由于可对融合基因完整测序,能够直观地检测出断裂点。

### 3.5 注意事项

**3.5.1 CYP21A2 基因重复对等位基因致病性判读的影响** 研究发现 7% 的正常人携带 CYP21A2 的重复,且通常不影响基因的功能。额外的拷贝有时会合并致病变异,且以 p.Gln319\* 多见<sup>[64]</sup>。此时对等位基因进行致病性判断,需明确 CYP21A2 基因有无致病变异,并明确携带致病变异的拷贝与正常拷贝在两条等位基因上的分布情况,从而综合判断每条等位基因是否正常,否则可能造成错误的解读<sup>[65]</sup>。例如,对于 CYP21A2 基因重复,存在一种常见的单倍型,即两个 CYP21A2 拷贝位于同一条染色体上,其中一个为正常,另一个则携带 p.Gln319\* 变异(图 5A)。这种单倍型由于有一个正常的 CYP21A2 基因,等位基因为正常。若一条等位基因为上述单倍型,另一条为正常的 CYP21A2 基因单倍型,则两条 CYP21A2 等位基因均具有正常功能。然而,在减数分裂的过程中,若两条等位基因发生同源重组,则将产生一条仅携带致病变异的 CYP21A2 基因的染色体和一条包含两个正常 CYP21A2 拷贝的染色体,使子代成为 p.Gln319\* 杂合携带者(图 5B)。另有一种杂合携带的情况容易被误判为患者(图 5C),即个体的一条染色体携带 2 个 CYP21A2 拷贝(其中一个包含 p.Gln319\*),另一条染色体上的 CYP21A2 拷贝则携带致病变异。若仅进行 Sanger 测序,则容易将两条等位基因均判断为致病性,将携带者误判为患者。

需要注意的是,当存在 CYP21A2 基因重复时,由

表 2 目前针对 CAH 的主要基因诊断方法

	原理	检测变异	应用及局限性
MLPA	针对真基因特异位点设计探针,检测外显子 CNV	CYP21A2 外显子缺失/重复	目前推荐 MLPA 结合 Sanger 测序作为 21-OHD 的基因诊断方法;检测步骤多,较繁琐,检测周期长,价格高;需要结合家系判断变异的顺反式,对重复分型存在困难,容易出现错误判读;
Sanger 测序	针对真基因设计特异性扩增引物,检测小尺度变异	CYP21A2 点变异、小插入缺失	对非编码区变异和下游的 TNBX 基因覆盖不好,导致非编码区变异和 CAH-X 的漏检。
二代测序	捕获 CAH 相关基因序列,然后通过短片段高通量测序检测变异	除 CYP21A2 外的 CAH 相关基因变异	适合非 21-OHD CAH 的鉴别诊断;对 CYP21A2 检测效果不佳。
三代测序	将真假基因全部扩增,然后通过长片段测序分别检测	CYP21A2 点变异、小插入缺失、外显子缺失/重复	能够全面检测 CYP21A2 基因的变异;目前基于长片段扩增。在极罕见的情况下,若引物区存在变异,会出现脱扣的现象。

注:MLPA 为多重连接探针扩增,CAH 为先天性肾上腺皮质增生症,21-OHD 为 21-羟化酶缺陷,CNV 为拷贝数变异

于基因重复数目变多,会改变测序峰图上变异峰的高度,可以佐证 MLPA 的结果<sup>[49]</sup>。

**3.5.2 判读错误的原因及解决方案** 在CYP21A2 的分析过程中,可能会出现假阴性的结果和判读错误,其原因包括:

① 等位基因脱扣。需使用多对覆盖CYP21A2 基因的引物对真基因进行扩增,确保不会因引物特异性问题而导致漏检。

② CYP21A2 基因重复携带变异。重复拷贝若包含 MLPA 特异性结合位点的变异,可导致 MLPA 无法检测出此重复。出现这种情况时,需仔细观察测序峰图,并结合 MLPA 的结果进行判读。

③ 漏检杂合携带者。CYP21A2 基因的拷贝数尽管为 2,但两个CYP21A2 基因位于同一条染色体上,另一条染色体为CYP21A2 基因完全缺失。此时需结合家系数据和单倍型分析对CYP21A2 基因的在两条

等位基因上的分布进行准确的分析。

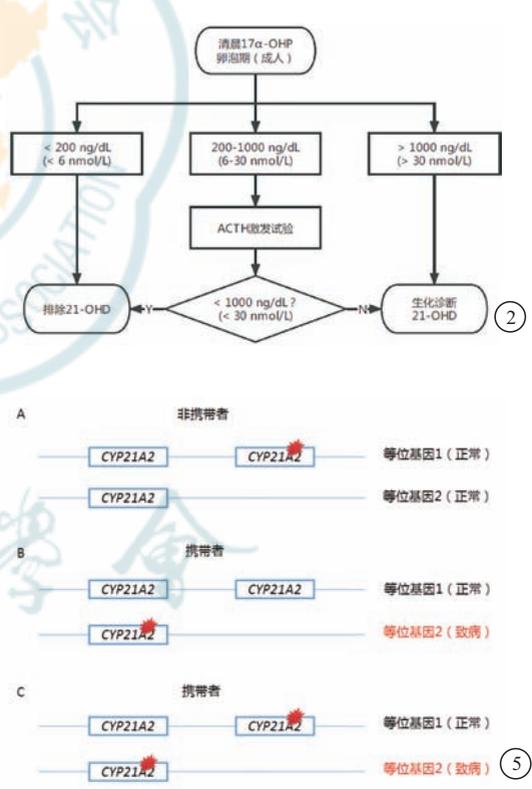
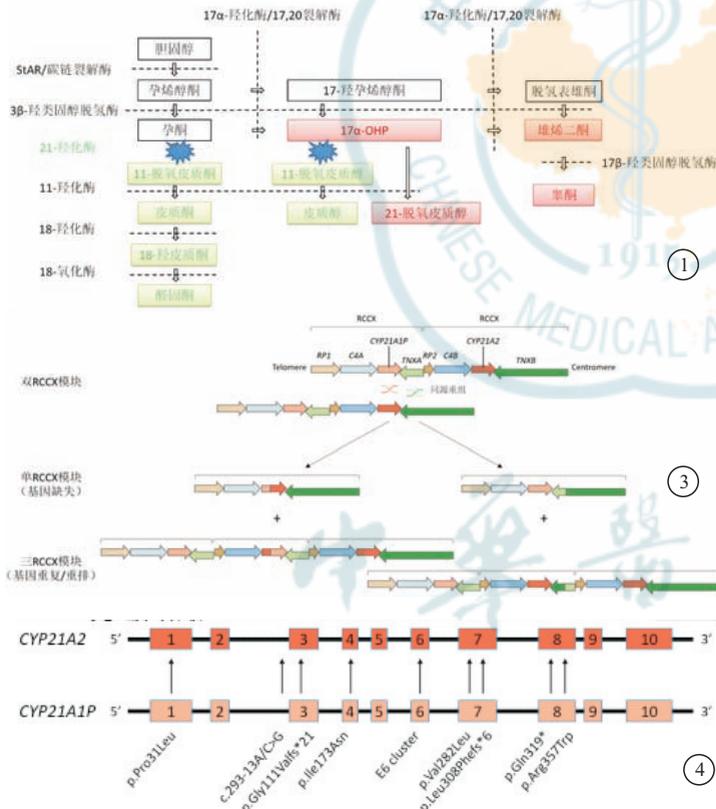
④ 在某些情况下,真假基因重组形成的融合基因可能被同时扩增,检测到的致病变异可能被错误地定位到功能基因上。此时需采用多对覆盖CYP21A2 基因的引物对真基因进行扩增,并结合家系数据和单倍型分析对融合基因的结构进行准确的分析。

### 4 基于实验室诊断的遗传咨询

21-OHD 的遗传咨询可通过对先证者进行基因检测,结合家族史,为患者家庭提供可能的疾病病程、家庭成员的遗传状况等信息。

#### 4.1 风险评估

**4.1.1 先证者的父母** 在大多数情况下,先证者的父母均为杂合携带者,并缺乏相关表型。在极少数情况下,父母一方可能患有 NC 型 21-OHD,但症状轻微,而另一方为杂合携带者,此时需对先证者的父母进行



**图 1** 21-OHD 的病理生理学 **图 2** 21-OHD 的生化诊断 17α-OHP 的水平检测应在清晨(上午 8 点前)进行。对于育龄期女性,应在卵泡期进行类固醇激素的测量,其结果可能因检测方法而异。经典型 21-OHD 的患者,包括 21-OHD 的 SW 型和 SV 型,其未经激发的 17α-OHP 值通常超过 30 nmol/L,需注意 SV 型和 NC 型的 CAH 患者 17α-OHP 水平可能难以区分 **图 3** RCCX 模块的示意图 正常的染色体包含双 RCCX 模块,两条染色体可在 CYP21A2-CYP21A1P 或 TNXA-TNXB 基因区域发生同源重组,形成单 RCCX 模块(基因缺失)和三 RCCX 模块(基因重复/重排)。单 RCCX 模块包括 CYP21A1P/A2 融合基因或完整的 CYP21A1P 假基因。三 RCCX 模块中增加的 RCCX 模块包括 CYP21A2/A1P 融合基因或完整的 CYP21A2 真基因 **图 4** 真基因 CYP21A2 和假基因 CYP21A1P 造成的致病位点的差异。真假基因之间可能发生微交换,导致 CYP21A2 获得个别 CYP21A1P 上的点变异或 indel,或者通过大片的基因重组导致 CYP21A2 缺失或获得多个 CYP21A1P 部分片段 **图 5** CYP21A2 基因重复对等位基因致病性判读的影响 额外的 CYP21A2 基因常合并致病变异。5A: 如果一个致病的 CYP21A2 与另一个正常的 CYP21A2 在同一条染色体上,则该等位基因为正常;5B: 如果携带致病变异的 CYP21A2 拷贝单独在一条染色体上,则此等位基因为致病性;5C: 为携带者的另一种情况,其中一条等位基因上存在一个致病的 CYP21A2 与一个正常的 CYP21A2,另一条等位基因则携带一个致病性变异。如果仅进行 Sanger 测序,则容易将此受检者误认为两条等位基因均异常的患者

生化检测和基因诊断以排除 NC 型 21-OHD。另有约 1% 的 CYP21A2 致病变异为新发,存在父母仅一方为杂合子的情况<sup>[66]</sup>。

**4.1.2 先证者的同胞** 若先证者的父母均为杂合子,则先证者的同胞有 25% 的机率罹患 21-OHD,有 50% 的机率成为无症状携带者,25% 的机率为非携带者。若先证者的父母一方为杂合子,另一方患有 21-OHD,则其同胞有 50% 的机率患病,并有 50% 的机率为杂合携带者。

**4.1.3 先证者的后代** 先证者可将一条致病性等位基因传递给子代。鉴于 CYP21A2 基因的致病变异在人群中的携带率约为 1/60<sup>[31]</sup>,应向先证者的伴侣提供全面的 CYP21A2 基因检测。若其伴侣为非致病变异杂合携带者,则子代患 21-OHD 的风险显著降低。但鉴于 CYP21A2 基因存在一定的新发变异比例(1%),故无法完全排除其子代患病的风险。若其伴侣为携带者,则后代受累的风险为 50%。

建议通过介入性产前诊断明确胎儿的基因型。较好的基因型-表现型相关性将有助于为患病家庭制订生育计划,但须注意基因型-表现型的相关性存在局限性,无法完全准确地预测子代的表型(参见 21-OHD 基因诊断的部分)。

**4.1.4 其他家庭成员** 先证者父母的同胞有 50% 的风险为 CYP21A2 致病性变异的携带者。

## 4.2 携带者检测

在 ACTH 激发的条件下,携带者的 17 $\alpha$ -OHP 血清浓度可能略高于非携带者,但杂合子和非携带者之间存在重叠。因此,基因诊断是携带者检测的首选方法。

对高危亲属进行携带者检测,需要先确定家族中患病成员的 CYP21A2 致病变异。考虑到 CYP21A2 基因重复可能会合并 p.Gln319\* 杂合致病变异。对有 CYP21A2 重复的杂合子,需结合家系数据对其进行单倍型分析,才能准确判断出其是否为杂合携带者(参见 21-OHD 基因诊断的部分)。

## 4.3 生育计划

需向受累家庭、携带者或有携带者风险的夫妇提供关于生育计划的遗传咨询。最好在怀孕前确定遗传风险和携带者状态,可帮助夫妇制订合适的妊娠计划,提供植入前/产前基因诊断的依据。

## 5 鉴别诊断

在大规模筛查中,具有高 17 $\alpha$ -OHP 水平的其他 CAH 疾病包括 PORD、3 $\beta$ -HSD 和 11 $\beta$ -OHD。

PORD 和 21-OHD 可通过分析血类固醇激素谱

进行鉴别<sup>[67-68]</sup>。PORD 患者的电解质水平通常正常,新生儿肾上腺皮质功能不全很少见。PORD 女孩(46, XX)可出现外生殖器男性化,而在 46, XY 的 PORD 男孩中不完全男性化通常合并颅缝早闭、特征性面容、桡骨关节融合和关节挛缩<sup>[69-70]</sup>。

3 $\beta$ -HSD 缺乏可能导致 46, XX 女孩的外生殖器男性化和 46, XY 男孩的不完全男性化,引起肾上腺功能不全。需测定血类固醇激素谱,根据孕烯醇酮/孕酮、17-羟孕烯醇酮/17 $\alpha$ -OHP 和脱氢表雄酮/雄烯二酮的比例进行诊断<sup>[71-72]</sup>。

11 $\beta$ -OHD 以高血压为特征,但部分新生儿可无高血压的表现<sup>[3,73]</sup>。与 21-OHD 相比,11 $\beta$ -OHD 的血浆肾素浓度或活性降低、血浆醛固酮水平升高、脱氧皮质酮和 11-脱氧皮质醇水平在基线时、ACTH 激发试验后增加<sup>[74]</sup>。通过出生后 3 ~ 4 个月的多项血类固醇激素谱分析可诊断 3 $\beta$ -HSD、11 $\beta$ -OHD、21-OHD 和 PORD。

此外,肾上腺肿瘤也可能导致 17 $\alpha$ -OHP 水平升高。但与 21-OHD 相比,肾上腺肿瘤通常为单侧病变;功能性肾上腺肿瘤可伴有皮质醇或醛固酮水平升高;恶性病变会伴影像学等特殊表现。临床疑似患者应通过基因检测进行鉴别诊断。

基因检测也可用于鉴别 17 $\alpha$ -OHD、PORD、3 $\beta$ -HSD 和 11 $\beta$ -OHD<sup>[75]</sup>。尤其是靶向测序等高通量测序技术可一次性检测相关基因的致病变异,实现对 CAH 的鉴别诊断<sup>[61-62]</sup>。

本共识建议应重视并规范 21-OHD 的实验室诊断方法,提供了各种生化及基因诊断方法的介绍及注意事项,并强调了基于实验室诊断的遗传咨询。实验室诊断是确诊 21-OHD 的关键,对其诊治和三级防控的开展具有重要的价值。希望本共识可为国内同行提供参考。

参与本共识制定的人员(以单位及姓名为序):广西医科大学第二附属医院(陈少科、范歆);广州市妇女儿童医疗中心(黄永兰);首都医科大学附属北京儿童医院(巩纯秀);华中科技大学同济医学院附属同济医院(罗小平);三亚市妇幼保健院(王洁);南京市妇幼保健院(许争锋);上海市儿童医院/上海交通大学医学院附属儿童医院(邹琳、李嫔);上海交通大学医学院附属国际和平妇幼保健院(王剑);复旦大学附属儿科医院(王艺);上海交通大学医学院附属瑞金医院(叶蕾);上海交通大学医学院附属新华医院(梁黎黎、占霞、邱文娟、孙昱、余永国、顾学范);中南大学(邹玲仟);浙江大学医学院附属儿童医院(杨茹棠)

## 参 考 文 献

- [1] Speiser PW, White PC. Congenital adrenal hyperplasia [J]. N Engl J Med, 2003, 349 (8): 776-788. DOI: 10.1056/NEJMra021561.
- [2] Kirkgoz T, Guran T. Primary adrenal insufficiency in children:

- diagnosis and management [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2018, 32(4): 397-424. DOI: 10.1016/j.beem.2018.05.010.
- [3] Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders [J]. *Endocr Rev*, 2011, 32(1): 81-151. DOI: 10.1210/er.2010-0013.
- [4] White PC, Speiser PW. Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency [J]. *Endocr Rev*, 2000, 21(3): 245-291. DOI: 10.1210/edrv.21.3.0398.
- [5] Gidlof S, Falhammar H, Thilen A, et al. One hundred years of congenital adrenal hyperplasia in Sweden: a retrospective, population-based cohort study [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2013, 1(1): 35-42. DOI: 10.1016/S2213-8587(13)70007-X.
- [6] Speiser PW, Arlt W, Auchus RJ, et al. Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an endocrine society clinical practice guideline [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2018, 103(11): 4043-4088. DOI: 10.1210/jc.2018-01865.
- [7] Therrell BL, Jr., Berenbaum SA, Manter-Kapanke V, et al. Results of screening 1.9 million Texas newborns for 21-hydroxylase-deficient congenital adrenal hyperplasia [J]. *Pediatrics*, 1998, 101(4 Pt 1): 583-590. DOI: 10.1542/peds.101.4.583.
- [8] Dundar A, Bayramov R, Onal MG, et al. The molecular basis and genotype-phenotype correlations of congenital adrenal hyperplasia (CAH) in Anatolian population [J]. *Mol Biol Rep*, 2019, 46(4): 3677-3690. DOI: 10.1007/s11033-019-04809-4.
- [9] Rodrigues NR, Dunham I, Yu CY, et al. Molecular characterization of the HLA-linked steroid 21-hydroxylase B gene from an individual with congenital adrenal hyperplasia [J]. *EMBO J*, 1987, 6(6): 1653-1661. DOI: 10.1002/j.1460-2075.1987.tb02414.x.
- [10] Araujo RS, Mendonca BB, Barbosa AS, et al. Microconversion between *CYP21A2* and *CYP21A1P* promoter regions causes the nonclassical form of 21-hydroxylase deficiency [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92(10): 4028-4034. DOI: 10.1210/jc.2006-2163.
- [11] Huynh T, McGown I, Cowley D, et al. The clinical and biochemical spectrum of congenital adrenal hyperplasia secondary to 21-hydroxylase deficiency [J]. *Clin Biochem Rev*, 2009, 30(2): 75-86.
- [12] Parsa AA, New MI. Steroid 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2017, 165(Pt A): 2-11. DOI: 10.1016/j.jsmb.2016.06.015.
- [13] Reisch N, Taylor AE, Nogueira EF, et al. Alternative pathway androgen biosynthesis and human fetal female virilization [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2019, 116(44): 22294-22299. DOI: 10.1073/pnas.1906623116.
- [14] O'Shaughnessy PJ, Antignac JP, Le Bizec B, et al. Alternative (backdoor) androgen production and masculinization in the human fetus [J]. *PLoS Biol*, 2019, 17(2): e3000002. DOI: 10.1371/journal.pbio.3000002.
- [15] Hines M, Brook C, Conway GS. Androgen and psychosexual development: core gender identity, sexual orientation and recalled childhood gender role behavior in women and men with congenital adrenal hyperplasia (CAH) [J]. *J Sex Res*, 2004, 41(1): 75-81. DOI: 10.1080/00224490409552215.
- [16] Bachelot A, Chakthoura Z, Rouxel A, et al. Classical forms of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency in adults [J]. *Horm Res*, 2008, 69(4): 203-211. DOI: 10.1159/000113020.
- [17] New MI. Extensive clinical experience: nonclassical 21-hydroxylase deficiency [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2006, 91(11): 4205-4214. DOI: 10.1210/jc.2006-1645.
- [18] Escobar-Morreale HF, Sanchon R, San Millan JL. A prospective study of the prevalence of nonclassical congenital adrenal hyperplasia among women presenting with hyperandrogenic symptoms and signs [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008, 93(2): 527-533. DOI: 10.1210/jc.2007-2053.
- [19] van der Kamp HJ, Wit JM. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia [J]. *Eur J Endocrinol*, 2004, 151 Suppl 3: U71-U75. DOI: 10.1530/eje.0.151u071.
- [20] Claahsen-van der Grinten HL, Speiser PW, Ahmed SF, et al. Congenital adrenal hyperplasia - current insights in pathophysiology, diagnostics, and management [J]. *Endocr Rev*, 2022, 43(1): 91-159. DOI: 10.1210/edrv/bnab016.
- [21] Li Z, Huang L, Du C, et al. Analysis of the screening results for congenital adrenal hyperplasia involving 7.85 million newborns in China: A systematic review and meta-analysis [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12: 624507. DOI: 10.3389/fendo.2021.624507.
- [22] 国家卫健委临床检验中心新生儿疾病筛查室间质量评价委员会. 新生儿疾病筛查滤纸血片采集和递送及保存专家共识 [J]. *中华检验医学杂志*, 2019, 42(10): 5. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-8158.2019.10.005.
- External Quality Assessment Committee for Neonatal Disease Screening of Clinical Laboratory Center of National Health and Health Commission. Expert consensus on collection, delivery and preservation of neonatal disease screening filtration paper [J]. *Chin J Lab Med*, 2019, 42(10): 5. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1009-8158.2019.10.005.
- [23] Jiang X, Tang F, Feng Y, et al. The adjustment of 17-hydroxyprogesterone cut-off values for congenital adrenal hyperplasia neonatal screening by GSP according to gestational age and age at sampling [J]. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2019, 32(11): 1253-1258. DOI: 10.1515/jpem-2019-0140.
- [24] de Hora MR, Heather NL, Patel T, et al. Measurement of 17-hydroxyprogesterone by LCMSMS improves newborn screening for CAH due to 21-hydroxylase deficiency in New Zealand [J]. *Int J Neonatal Screen*, 2020, 6(1): 6. DOI: 10.3390/ijns6010006.
- [25] Tsuji-Hosokawa A, Kashimada K. Thirty-year lessons from the newborn screening for congenital adrenal hyperplasia (CAH) in Japan [J]. *Int J Neonatal Screen*, 2021, 7(3): 36. DOI: 10.3390/ijns7030036.
- [26] Auchus RJ, Witchel SF, Leight KR, et al. Guidelines for the development of comprehensive care centers for congenital adrenal hyperplasia: guidance from the CARES Foundation Initiative [J]. *Int J Pediatr Endocrinol*, 2010, 2010: 275213. DOI: 10.1155/

- 2010/275213.
- [27] Gonzalez RR, Maentausta O, Solyom J, et al. Direct solid-phase time-resolved fluoroimmunoassay of 17 alpha-hydroxyprogesterone in serum and dried blood spots on filter paper[J]. *Clin Chem*, 1990, 36(9): 1667-1672.
- [28] van der Kamp HJ, Oudshoorn CG, Elvers BH, et al. Cutoff levels of 17-alpha-hydroxyprogesterone in neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia should be based on gestational age rather than on birth weight[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2005, 90(7): 3904-3907. DOI: 10.1210/jc.2004-2136.
- [29] Zhan X, Han L, Qiu W, et al. Steroid profile in dried blood spots by liquid chromatography tandem mass spectrometry: Application to newborn screening for congenital adrenal hyperplasia in China[J]. *Steroids*, 2022, 185: 109056. DOI: 10.1016/j.steroids.2022.109056.
- [30] Lai F, Srinivasan S, Wiley V. Evaluation of a two-tier screening pathway for congenital adrenal hyperplasia in the new south wales newborn screening programme[J]. *Int J Neonatal Screen*, 2020, 6(3): 63. DOI: 10.3390/ijns6030063.
- [31] White PC. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2009, 5(9): 490-498. DOI: 10.1038/nrendo.2009.148.
- [32] Engels M, Pijnenburg-Kleizen KJ, Utari A, et al. Glucocorticoid activity of adrenal steroid precursors in untreated patients with congenital adrenal hyperplasia [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2019, 104(11): 5065-5072. DOI: 10.1210/jc.2019-00547.
- [33] Tieh PY, Yee JK, Hicks RA, et al. Utility of a precursor-to-product ratio in the evaluation of presumptive positives in newborn screening of congenital adrenal hyperplasia [J]. *J Perinatol*, 2017, 37(3): 283-287. DOI: 10.1038/jp.2016.223.
- [34] Janzen N, Sander S, Terhardt M, et al. Rapid steroid hormone quantification for congenital adrenal hyperplasia (CAH) in dried blood spots using UPLC liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Steroids*, 2011, 76(13): 1437-1442. DOI: 10.1016/j.steroids.2011.07.013.
- [35] Janzen N, Peter M, Sander S, et al. Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia: additional steroid profile using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2007, 92(7): 2581-2589. DOI: 10.1210/jc.2006-2890.
- [36] Miller WL. Congenital adrenal hyperplasia: time to replace 17OHP with 21-deoxycortisol[J]. *Horm Res Paediatr*, 2019, 91(6): 416-420. DOI: 10.1159/000501396.
- [37] Lasarev MR, Bialk ER, Allen DB, et al. Application of principal component analysis to newborn screening for congenital adrenal hyperplasia [J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2020, 105(8): dgaa371. DOI: 10.1210/clinem/dgaa371.
- [38] Schiffer L, Barnard L, Baranowski ES, et al. Human steroid biosynthesis, metabolism and excretion are differentially reflected by serum and urine steroid metabolomes: a comprehensive review[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2019, 194: 105439. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2019.105439.
- [39] Weitzman ED, Fukushima D, Nogeire C, et al. Twenty-four hour pattern of the episodic secretion of cortisol in normal subjects[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1971, 33(1): 14-22. DOI: 10.1210/jcem-33-1-14.
- [40] Nimkarn S, Gangishetti PK, Yau M, et al. 21-hydroxylase-deficient congenital adrenal hyperplasia. In: *GeneReviews® [Internet]*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993. 2002 Feb 26 [updated 2016 Feb 4].
- [41] Ye L, Zhao Z, Ren H, et al. A multiclassifier system to identify and subtype congenital adrenal hyperplasia based on circulating steroid hormones[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2022, 107(8): e3304-e3312. DOI: 10.1210/clinem/dgac271.
- [42] Wang R, Hartmann MF, Tiosano D, et al. Characterizing the steroidal milieu in amniotic fluid of mid-gestation: A GC-MS study[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2019, 193: 105412. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2019.105412.
- [43] Day DJ, Speiser PW, Schulze E, et al. Identification of non-amplifying *CYP21* genes when using PCR-based diagnosis of 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia (CAH) affected pedigrees[J]. *Hum Mol Genet*, 1996, 5(12): 2039-2048. DOI: 10.1093/hmg/5.12.2039.
- [44] Higashi Y, Yoshioka H, Yamane M, et al. Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986, 83(9): 2841-2845. DOI: 10.1073/pnas.83.9.2841.
- [45] White PC, New MI, Dupont B. Structure of human steroid 21-hydroxylase genes[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986, 83(14): 5111-5115. DOI: 10.1073/pnas.83.14.5111.
- [46] Blanchong CA, Zhou B, Rupert KL, et al. Deficiencies of human complement component C4A and C4B and heterozygosity in length variants of *RP-C4-CYP21-TNX* (*RCCX*) modules in Caucasians. The load of *RCCX* genetic diversity on major histocompatibility complex-associated disease [J]. *J Exp Med*, 2000, 191(12): 2183-2196. DOI: 10.1084/jem.191.12.2183.
- [47] den Dunnen JT, Dalgleish R, Maglott DR, et al. HGVS recommendations for the description of sequence variants; 2016 update[J]. *Hum Mutat*, 2016, 37(6): 564-569. DOI: 10.1002/humu.22981.
- [48] Pignatelli D, Carvalho BL, Palmeiro A, et al. The complexities in genotyping of congenital adrenal hyperplasia: 21-hydroxylase deficiency[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2019, 10: 432. DOI: 10.3389/fendo.2019.00432.
- [49] Baumgartner-Parzer S, Witsch-Baumgartner M, Hoepfner W. EMQN best practice guidelines for molecular genetic testing and reporting of 21-hydroxylase deficiency [J]. *Eur J Hum Genet*, 2020, 28(10): 1341-1367. DOI: 10.1038/s41431-020-0653-5.
- [50] Riggs ER, Andersen EF, Cherry AM, et al. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen) [J]. *Genet Med*, 2020, 22(2): 245-257. DOI: 10.1038/s41436-019-0686-8.
- [51] Richards CS, Bale S, Bellissimo DB, et al. ACMG recommendations for standards for interpretation and reporting of sequence variations; revisions 2007 [J]. *Genet Med*, 2008, 10

- (4): 294-300. DOI: 10.1097/GIM.0b013e31816b5cae.
- [52] Concolino P, Costella A. Congenital adrenal hyperplasia (CAH) due to 21-hydroxylase deficiency: a comprehensive focus on 233 pathogenic variants of *CYP21A2* gene[J]. Mol Diagn Ther. 2018, 22(3): 261-280. DOI: 10.1007/s40291-018-0319-y.
- [53] Xu C, Jia W, Cheng X, et al. Genotype-phenotype correlation study and mutational and hormonal analysis in a Chinese cohort with 21-hydroxylase deficiency[J]. Mol Genet Genomic Med, 2019, 7(6): e671. DOI: 10.1002/mgg3.671.
- [54] Wilson RC, Mercado AB, Cheng KC, et al. Steroid 21-hydroxylase deficiency: genotype may not predict phenotype[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1995, 80(8): 2322-2329. DOI: 10.1210/jcem.80.8.7629224.
- [55] Nandagopal R, Sinaii N, Avila NA, et al. Phenotypic profiling of parents with cryptic nonclassic congenital adrenal hyperplasia: findings in 145 unrelated families[J]. Eur J Endocrinol, 2011, 164(6): 977-984. DOI: 10.1530/EJE-11-0019.
- [56] Chen W, Xu Z, Sullivan A, et al. Junction site analysis of chimeric *CYP21A1P/CYP21A2* genes in 21-hydroxylase deficiency[J]. Clin Chem, 2012, 58(2): 421-430. DOI: 10.1373/clinchem.2011.174037.
- [57] Concolino P, Falhammar H. CAH-X syndrome: genetic and clinical profile[J]. Mol Diagn Ther, 2022, 26(3): 293-300. DOI: 10.1007/s40291-022-00588-0.
- [58] Parajes S, Quinteiro C, Dominguez F, et al. High frequency of copy number variations and sequence variants at *CYP21A2* locus: implication for the genetic diagnosis of 21-hydroxylase deficiency[J]. PLoS One, 2008, 3(5): e2138. DOI: 10.1371/journal.pone.0002138.
- [59] Schulze E, Bettendorf M, Maser-Gluth C, et al. Allele-dropout using PCR-based diagnosis for the splicing mutation in intron-2 of the *CYP21B*-gene: successful amplification with a *Taq/Pwo*-polymerase mixture[J]. Endocr Res, 1998, 24(3-4): 637-641. DOI: 10.3109/07435809809032662.
- [60] Menabo S, Balsamo A, Baldazzi L, et al. A sequence variation in 3' UTR of *CYP21A2* gene correlates with a mild form of congenital adrenal hyperplasia[J]. J Endocrinol Invest, 2012, 35(3): 298-305. DOI: 10.3275/7680.
- [61] Wang W, Han R, Yang Z, et al. Targeted gene panel sequencing for molecular diagnosis of congenital adrenal hyperplasia[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2021, 211: 105899. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2021.105899.
- [62] Liu Y, Chen M, Liu J, et al. Comprehensive analysis of congenital adrenal hyperplasia using long-read sequencing[J]. Clin Chem, 2022, 68(7): 927-939. DOI: 10.1093/clinchem/hvac046.
- [63] Tantirukdham N, Sahakitrungruang T, Chaisiwamongkol R, et al. Long-read amplicon sequencing of the *CYP21A2* in 48 Thai patients with steroid 21-hydroxylase deficiency [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2022, 107(7): 1939-1947. DOI: 10.1210/clinem/dgac187.
- [64] Kleinle S, Lang R, Fischer GF, et al. Duplications of the functional *CYP21A2* gene are primarily restricted to Q318X alleles: evidence for a founder effect [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2009, 94(10): 3954-3958. DOI: 10.1210/jc.2009-0487.
- [65] Lekarev O, Tafuri K, Lane AH, et al. Erroneous prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia owing to a duplication of the *CYP21A2* gene[J]. J Perinatol, 2013, 33(1): 76-78. DOI: 10.1038/jp.2012.5.
- [66] Krone N, Braun A, Roscher AA, et al. Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85(3): 1059-1065. DOI: 10.1210/jcem.85.3.6441.
- [67] Koyama Y, Homma K, Fukami M, et al. Two-step biochemical differential diagnosis of classic 21-hydroxylase deficiency and cytochrome P450 oxidoreductase deficiency in Japanese infants by GC-MS measurement of urinary pregnanetriolone/ tetrahydrocortisone ratio and 11beta-hydroxyandrosterone[J]. Clin Chem, 2012, 58(4): 741-747. DOI: 10.1373/clinchem.2011.173286.
- [68] Homma K, Hasegawa T, Nagai T, et al. Urine steroid hormone profile analysis in cytochrome P450 oxidoreductase deficiency: implication for the backdoor pathway to dihydrotestosterone[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2006, 91(7): 2643-2649. DOI: 10.1210/jc.2005-2460.
- [69] Fluck CE, Tajima T, Pandey AV, et al. Mutant P450 oxidoreductase causes disordered steroidogenesis with and without Antley-Bixler syndrome[J]. Nat Genet, 2004, 36(3): 228-230. DOI: 10.1038/ng1300.
- [70] Krone N, Reisch N, Idkowiak J, et al. Genotype-phenotype analysis in congenital adrenal hyperplasia due to P450 oxidoreductase deficiency[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2012, 97(2): E257-E267. DOI: 10.1210/jc.2011-0640.
- [71] Simard J, Ricketts ML, Gingras S, et al. Molecular biology of the 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family[J]. Endocr Rev, 2005, 26(4): 525-582. DOI: 10.1210/er.2002-0050.
- [72] Mermejo LM, Elias LL, Marui S, et al. Refining hormonal diagnosis of type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency in patients with premature pubarche and hirsutism based on *HSD3B2* genotyping [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2005, 90(3): 1287-1293. DOI: 10.1210/jc.2004-1552.
- [73] White PC, Curnow KM, Pascoe L. Disorders of steroid 11 beta-hydroxylase isozymes[J]. Endocr Rev, 1994, 15(4): 421-438. DOI: 10.1210/edrv-15-4-421.
- [74] Turcu AF, Rege J, Auchus RJ, et al. 11-Oxygenated androgens in health and disease[J]. Nat Rev Endocrinol, 2020, 16(5): 284-296. DOI: 10.1038/s41574-020-0336-x.
- [75] Li Z, Liang Y, Du C, et al. Clinical applications of genetic analysis and liquid chromatography tandem-mass spectrometry in rare types of congenital adrenal hyperplasia [J]. BMC Endocr Disord, 2021, 21(1): 237. DOI: 10.1186/s12902-021-00901-8.

(收稿日期:2023-03-30)

(本文编辑 李岭)