

儿童结节性硬化症 TSC2 基因突变 2 例报道

高珊^{1,2}, 谢咏梅^{1,2△}, 汪志凌^{1,2}

1. 四川大学华西第二医院 神经消化科(成都 610041); 2. 出生缺陷与相关妇科疾病教育重点实验室(四川大学)(成都 610041)

【摘要】 目的 分析 2 例儿童结节性硬化症(TSC)散发病例 TSC1 和 TSC2 基因突变情况。**方法** 采用高通量测序技术和多重连接探针扩增(MLPA)相结合的方式对两例 TSC 家系先证者外周血 DNA 行 TSC 相关基因(TSC1、TSC2)检测,确定基因突变位点,并针对突变位点设计扩增引物,采用聚合酶链反应和 Sanger 测序法对先证者及其父母外周血 DNA 行二代测序验证。**结果** 家系 1 先证者存在 TSC2 基因(chr16),c.1228(外显子 12)_c.1229(外显子 12)insG(p.L410RfsX11)杂合突变,该突变为新发移码突变;家系 2 先证者存在 TSC2 基因(chr16),c.4925G>A(外显子 38)(p.G1642D)杂合突变,该突变为新发错义突变。**结论** 检测出 2 例 TSC 患者均出现 TSC 相关基因新发突变,但这 2 个新发突变与疾病的关系还需经突变蛋白功能细胞模型和动物模型的进一步验证。

【关键词】 结节性硬化症 TSC2 基因 移码突变 错义突变 儿童

结节性硬化症(tuberous sclerosis complex, TSC)是一种少见的常染色体显性遗传病,以全身多组织、多器官出现错构瘤增生为特征,常可累及脑、皮肤、心脏、肾脏、肺和眼等器官^[1]。临床表现多样且和年龄相关,如癫痫、智力落后或倒退、自闭症、血管纤维瘤、鲨革皮样斑、甲周纤维瘤、心脏横纹肌瘤、肾血管平滑肌脂肪瘤、淋巴管平滑肌瘤等,成人症状较儿童多样,但心脏错构瘤改变以儿童多见^[2]。新生儿年发病率约为 1:6 000 至 1:10 000^[3],其中散发型病例约占 2/3^[4],提示其有高度的自发突变率。目前已确定的致病基因为 TSC1 和 TSC2 基因,分别位于染色体 9q34.3 和 16p13.3。前者编码包含 1164 个氨基酸的错构瘤蛋白(Hamartin);后者编码包含 1807 个氨基酸的马铃薯蛋白(Tuberin)^[5]。TSC1 和 TSC2 基因的致病突变包括移码突变、错义突变、无义突变、剪接突变、缺失或插入。二者均无突变热点。我院新发现 2 例 TSC2 基因突变,现报道如下。

1 对象与方法

1.1 研究对象

家系 1 先证者,男,8 月龄,汉族,四川省乐山市人。母孕期无异常。患儿系 G₁P₂,足月剖宫产娩出,否认有窒息抢救史。生后 2~3 月发现腹部色素脱失斑,7 月龄出现反复无诱因的点头拥抱样动作,成串出现,10⁺次/d,每次 1~3 min。入院后视频脑电图:多灶性(慢)、(多)棘(慢)波频繁发放,检测到的临床发作考虑痉挛发作;头颅 MRI:双侧大脑半球多发片状异常信号灶,双侧侧脑室室管膜下多发结节影,考虑结节性硬化病可能(图 1);心脏超声:室间隔及左室内强回声(疑横纹肌瘤);胸腹部 CT 平扫:左肾囊肿。发育落后,4 月龄可抬头,偶有逗笑,现 8 月龄可扶坐,不能独坐。起病(7 月龄)后出现竖颈不稳,不能逗笑等发育倒退现象。先证者父母及哥哥(3 岁)无 TSC 相关表现。

家系 2 先证者,男,5 月龄,汉族,四川省平昌江口镇人。母孕期无异常。患儿系 G₂P₂,足月剖宫产娩出,否认窒息抢救史。2 月龄发现额、颈、腹部、下肢色素脱失斑,且逐渐增多;4 月龄出现反复无诱因的点头拥抱样动作,成串出现,3~4 次/d,每次持续 1~2 min。入院后视频脑电图:多灶性尖(慢)、(多)棘(慢)波、慢波频繁发放,检测到的临床发作考虑痉挛发作;头颅 MRI:双侧侧脑室室管膜下大小不等的结节影,双侧颞叶深部、侧脑室下角旁、额叶、顶叶可见片状异常信号影,考虑多为结节性硬化(图 2);心脏超声:右心室内占位(横纹肌瘤?);胸部 CT 平扫:肺部炎症,右侧胸膜局限稍厚;肝胆胰脾、泌尿系超声:未见异常。3 月龄时可竖颈,现不能翻身,起病后(4 月龄)出现竖颈不稳,不能逗笑等发育倒退现象。先证者父母及姐姐无 TSC 相关表现。

1.2 先证者及家系 TSC 基因突变检测

在知情同意的前提下,取先证者、先证者父母外周血 2 mL,EDTA 抗凝,采用 BloodGen Midi Kit(CWBIO China 公司生产)试剂盒提取基因组 DNA,操作步骤按照说明书。对先证者进行靶向基因 TSC 测序并用多重连接探针扩增技术(MLPA)进行缺失或重复的检测,通过数据库过滤及生物信息学分析筛选候选位点,如发现已知点突变在家系内应用 Sanger 测序进行共分离验证,如新发变异位点在家系内共分离后,再在正常人基因数据库(DYDF,dbSNP,千人基因组,千人南方,千人北方,ExAC)中进行验证,排除其多态可能,并使用 Provean、Polyphen2、Sift、Mutationtaster、M-CAP、REVEL 软件或程序对发生突变的基因进行蛋白结构预测。

2 结果

家系 1 先证者检出 TSC2 基因(chr16),c.1228(外显子 12)_c.1229(外显子 12)insG(p.L410RfsX11)杂合突变(图 3),导致氨基酸序列在第 410 位的亮氨酸(L)变成了精氨酸(R),并在第 420 位提前终止编码,此为移码突变。家系 2 先

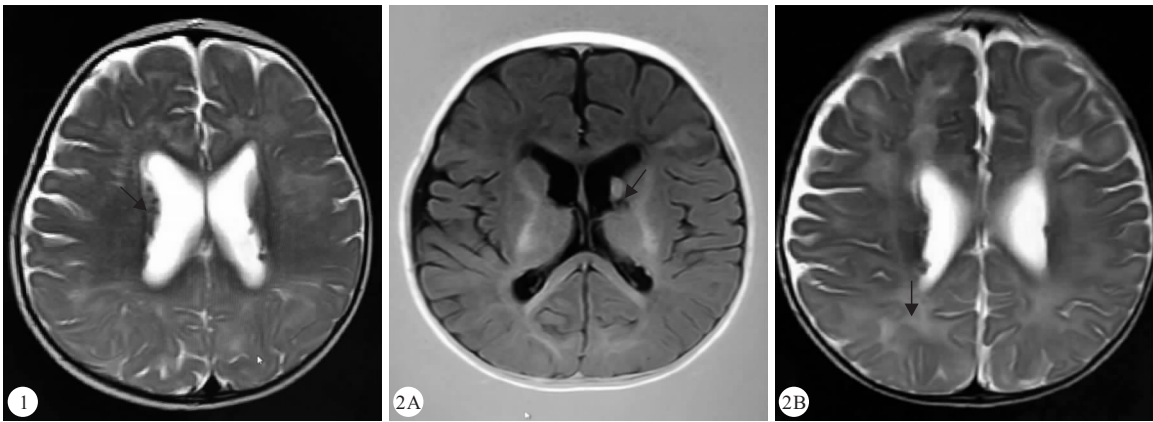


图 1 家系 1 先证者头颅 MRI 示：双侧侧脑室管膜下多发结节

图 2 先证者头颅 MRI 影像学特征

2A：右侧脑室管膜下巨细胞星形细胞瘤；2B：侧脑室下角旁、额叶、顶叶可见片状异常信号影

证者检出 TSC2 基因 (chr16), c. 4925G>A (外显子 38) (p. G1642D) 杂合突变 (图 4), 导致氨基酸序列在第 1642 位

的甘氨酸 (G) 变成了天冬氨酸 (D), 此为错义突变, 使用 Provean、Polyphen2、Sift、Mutationtaster、M-CAP、REVEL 软件或程序进行蛋白结构预测, 提示可能有害。二者的致病性尚未见文献报道。两家系先证者父母的相应位点均未见异常。

这 2 个突变在 OMIM、HGMD、Clinvar 数据库里未发现疾病相关性报道, 在正常人数据库 (DYDF, dbSNP, 千人基因组, 千人南方, 千人北方, ExAC) 中未见收录, 提示其为新发突变。

3 讨论

本研究中的 2 例患儿符合国际结节性硬化症共识大会在 2012 年发表的结节性硬化症最新诊断标准^[6], 且具有以下相似点: ①起病年龄相仿, 均为 1 岁前婴儿期起病。②均存在痉挛性癫痫发作、智力运动发育倒退等中枢神经系统损害。③均伴有心脏和皮肤损害。④均为 TSC2 基因突变, 均为杂合突变, 均对 GAP 功能域产生影响。⑤家系 1 先证者同父同母的哥哥和家系 2 先证者同父同母姐姐均无 TSC 临床表现。中枢神经系统损害是儿童 TSC 最突出的特点, 具体表现为难治性癫痫、自闭症、认知障碍、脑积水等神经系统功能异常和精神行为异常等^[7]。TSC2 基因突变导致的神经系统损害比 TSC1 基因更为常见^[8]。典型的病理表现包括皮层结节、脑室管膜下结节 (subependymal nodules, SENS) 及脑室管膜下巨细胞星形细胞瘤 (subependymal giant cell astrocytomas, SEGAs)^[9]。目前通常认为皮层结节和脑室管膜下巨细胞星形细胞瘤 (SEGAs) 可以引起神经系统症状, 而脑室管膜下结节 (SENS) 则不会。皮层结节是引起 TSC 患者癫痫表现的主要原因。同时皮层结节也可能是 TSC 患者认知障碍的原因。结节可以是单发或多发, 多累及额叶及枕叶, 也可累及小脑^[10]。早在妊娠 20 周就可以通过影像学检查发现胎儿神经系统的结节样改变^[6]。目前认为 TSC1 和 TSC2 突变发生在妊娠 7~20 周, 影响了神经前体细胞的正常发育, 导致细胞类型及组织结构异常。

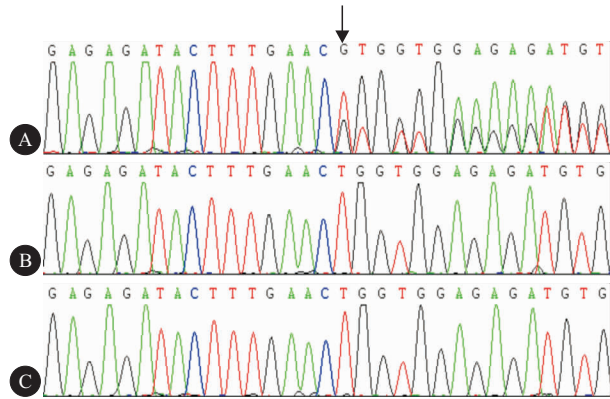


图 3 TSC2 基因 c. 1228-1229 insG 杂合突变测序结果 (箭头所示为突变位点)

A: 家系 1 先证者序列; B: 家系 1 先证者之父序列; C: 家系 1 先证者之母序列

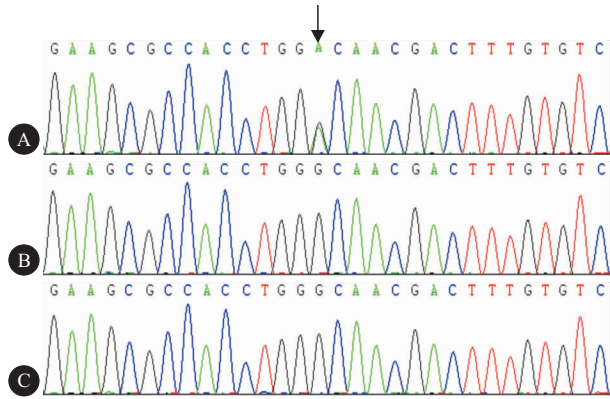


图 4 TSC2 基因 c. 4925 G>A 杂合突变测序结果 (箭头所示为突变位点)

A: 家系 1 先证者序列; B: 家系 1 先证者之父序列; C: 家系 1 先证者之母序列

到目前为止,文献已报告了超过 1 000 个 TSC1 和 TSC2 基因突变位点,几乎涵盖了 TSC1 和 TSC2 基因所有的外显子。TSC 患者中约有 60% 集中在 TSC2 基因突变,30% 存在 TSC1 基因突变^[11-12]。仍有 10%~25% 临床诊断的 TSC 患者中没有发现基因突变^[6],可能是因为检测灵敏度欠缺、内含子或启动子区域内突变、存在低丰度的 TSC 体细胞嵌合突变,或存在尚未确定的基因位点,如 TSC3 基因^[13]。TSC1 编码的错构瘤蛋白(Hamartin)和 TSC2 编码的马铃薯蛋白(Tuberin)具有高度亲和性,二者在细胞质内形成异源二聚体。TSC1 或 TSC2 基因发生突变时,影响 TSC1-TSC2 复合体(又称 Hamartin-Tuberin 复合体)的功能,导致 TSC2 的 GAP 功能域(GTPase 激活蛋白)异常,使哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号传导通路异常激活,导致核糖体蛋白 S6 激酶(S6K)去磷酸化减弱,使得对细胞增殖、血管生成、新陈代谢的抑制作用减弱或消失,造成细胞增殖过快而出现错构瘤损害^[14-17]。目前,国内外不断有报道发现 TSC2 基因移码和突变错义突变导致 GAP 功能域异常,从而引发 TSC^[18-20]。GAP 功能域位于第 1 531~1 758 位氨基酸,本研究中家系 1 先证者 TSC2 基因(chr16),c. 1228(外显子 12)_c. 1229(外显子 12)insG(p. L410RfsX11)杂合突变,氨基酸序列在第 420 位提前终止编码,终止于 GAP 功能域前,导致 GAP 功能域全部缺失,为其致病原因。家系 2 先证者 TSC2 基因(chr16),c. 4925G>A(外显子 38)(p. G1642D)杂合突变,导致位于 GAP 功能域的第 1642 位的甘氨酸(G)变成了天冬氨酸(D),GAP 功能域结构异常是其致病的原因。这 2 个突变在 OMIM、HGMD(www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php)、Clinvar 数据库里未发现疾病相关性报道,在正常人数据库(DYDF, dbSNP, 千人基因组, 千人南方, 千人北方, ExAC)中未见收录,提示其为新发突变。经过对氨基酸结构分析,结合先证者临床表现等,推测这两个突变为新发的致病性突变。

综上,儿童 TSC 最常累及神经系统,不仅导致了严重的精神运动发育的异常,也常常是致死的原因,给患儿本身、家庭以及社会带来严重的危害和负担,由此产前诊断尤为重要。本研究检出的 2 例新发突变,推测为致病基因,丰富了基因突变谱。但基因突变最终导致出现病理损害的过程,受体内、体外环境等多种因素的影响,发病机制非常复杂且尚未探明,需经突变蛋白功能细胞模型和动物模型的进一步验证。不断发现的新突变位点不仅为患病家系产前基因诊断提供了依据,也为我们提供更多的研究切入点。

参 考 文 献

- [1] ISMAIL NF, NIK ABDUL MALIK NM, MOHSENI J, *et al.* Two novel gross deletions of TSC2 in Malaysian patients with tuberous sclerosis complex and TSC2/PKD1 contiguous deletion syndrome. *Jpn J Clin Oncol*, 2014, 44(5):506-511.
- [2] KINGSWOOD JC, DE VRIES PJ. Tuberous sclerosis complex. *Paediatr Child Health*, 2015, 25(10):467-473.
- [3] OSBORNE JP, FRYER A, WEBB D. Epidemiology of tuberous sclerosis. *Ann NY Acad Sci*, 1991, 615:125-127.
- [4] HUANG CH, PENG SS, WENG WC, *et al.* The relationship of neuroimaging findings and neuropsychiatric comorbidities in children with tuberous sclerosis complex. *J Formos Med Assoc*, 2015, 114(9):849-854.
- [5] 李诚让. 结节性硬化症分子遗传学研究进展. 国外医学·遗传学分册, 2002(4):242-245.
- [6] KRUEGER DA, NORTHRUP H, International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Group. Tuberous sclerosis complex surveillance and management: recommendations of the 2012 International Tuberous Sclerosis Complex Consensus Conference. *Pediatr Neurol*, 2013, 49(4):255-265.
- [7] NAPOLIONI V, MOAVERO R, CURATOLO P. Recent advances in neurobiology of tuberous sclerosis complex. *Brain Dev*, 2009, 31(2):104-113.
- [8] DABORA SL, JOZWIAK S, FRANZ DN, *et al.* Mutational analysis in a cohort of 224 tuberous sclerosis patients indicates increased severity of TSC2, compared with TSC1, disease in multiple organs. *Am J Hum Genet*, 2001, 68(1):64-80.
- [9] MIZUGUCHI M, TAKASHIMA S. Neuropathology of tuberous sclerosis. *Brain Dev*, 2001, 23(7):508-515.
- [10] VAUGHN J, HAGIWARA M, KATZ J, *et al.* MRI Characterization and longitudinal study of focal cerebellar lesions in a young tuberous sclerosis cohort. *AJNR Am J Neuroradiol*, 2013, 34(3):655-659.
- [11] JONES AC, DANIELLS CE, SNELL RG, *et al.* Molecular genetic and phenotypic analysis reveals differences between TSC1 and TSC2 associated familial and sporadic tuberous sclerosis. *Hum Mol Genet*, 1997, 6(12):2155-2161.
- [12] JONES AC, SHYAMSUNDAR MM, THOMAS MW, *et al.* Comprehensive mutation analysis of TSC1 and TSC2-and phenotypic correlations in 150 families with tuberous sclerosis. *Am J Hum Genet*, 1999, 64(5):1305-1315.
- [13] QIN W, KOZLOWSKI P, TAILLON BE, *et al.* Ultra deep sequencing detects a low rate of mosaic mutations in tuberous sclerosis complex. *Hum Genet*, 2010, 127(5):573-582.
- [14] ASTRINIDIS A, HENSKE EP. Tuberous sclerosis complex: linking growth and energy signaling pathways with human disease. *Oncogene*, 2005, 24(50):7475-7481.
- [15] HUANG J, MANNING BD. The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem J*, 2008, 412(2):179-190.
- [16] DE WAELE L, LAGAE L, MEKAHLI D. Tuberous sclerosis complex: the past and the future. *Pediatr Nephrol*, 2015, 30(10):1771-1780.
- [17] MAZHAB-JAFARI MT, MARSHALL CB, HO J, *et al.* Structure-guided mutation of the conserved G3-box glycine in Rheb generates a constitutively activated regulator of mammalian target of rapamycin (mTOR). *J Biol Chem*, 2014, 289(18):12195-12201.
- [18] MAYER K. Characterisation of a novel TSC2 missense mutation in the GAP related domain associated with minimal clinical manifestations of tuberous sclerosis. *J Med Genet*, 2004, 41(5):e64[2018-04-10]. <http://www.jmedgenet.com/cgi/content/full/41/5/e64>. doi:10.1136/jmg.2003.010835.
- [19] YU Z, ZHANG X, GUO H, *et al.* A novel TSC2 mutation in a Chinese family with tuberous sclerosis complex. *J Genet*, 2014, 93(1):169-172.
- [20] 潘玉纯, 吴维青, 谢建生, 等. 结节性硬化症的两个 TSC2 基因新发框移突变. 中国当代儿科杂志, 2017, 19(3):308-312.

(2018-06-21 收稿, 2018-11-10 修回)

编辑 汤洁