

论著·临床研究

结节性硬化症的两个 TSC2 基因新发框移突变

潘玉纯^{1,2} 吴维青^{1,2} 谢建生^{1,2} 罗彩群^{1,2} 郝颖^{1,2}

(1. 南方医科大学深圳妇幼保健院产前诊断中心, 广东 深圳 518000;
2. 深圳市出生缺陷预防控制重点实验室, 广东 深圳 518000)

[摘要] 本研究采用高通量测序对两个结节性硬化症(TSC)家系先证者外周血DNA行TSC相关基因(TSC1、TSC2)及其拼接序列检测, 确定基因突变位点, 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行一代测序验证。两家系先证者分别存在TSC2基因c.3981-3982 insA(p.Asp1327AspfsX87)、c.4013-4014 delCA(p.Ser1338Cysfs)杂合突变。家系1先证者父母该位点均未见异常; 家系2先证者母亲检出TSC2基因c.4013-4014 delCA杂合突变, 先证者父亲、先证者外祖父母该位点未见异常。c.3981-3982 insA突变会导致氨基酸序列在第1413位提前终止编码, c.4013-4014 delCA突变导致氨基酸序列在第1412位提前终止编码, 二者分别为家系1、家系2的致病突变, 且均为新发框移突变, 但与疾病的关系仍需要突变蛋白功能细胞模型和动物模型的进一步验证。[中国当代儿科杂志, 2017, 19(3): 308-312]

[关键词] 结节性硬化症; TSC2基因; 框移突变; 儿童

Two novel TSC2 frameshift mutations in tuberous sclerosis complex

PAN Yu-Chun, WU Wei-Qing, XIE Jian-Sheng, LUO Cai-Qun, HAO Ying. Prenatal Diagnosis Center, Shenzhen Maternity and Child Health Care Hospital, Southern Medical University, Shenzhen, Guangdong 518000, China (Xie J-S, Email: jsxieszmch@aliyun.com)

Abstract: High-throughput sequencing was performed for the peripheral blood DNA from two probands in the family with tuberous sclerosis complex (TSC) to determine the sequences of TSC-related genes TSC1 and TSC2 and their splicing regions and identify mutation sites. Amplification primers were designed for the mutation sites and polymerase chain reaction and Sanger sequencing were used to verify the sequences of peripheral blood DNA from the probands and their parents. The two probands had c.3981-3982 insA (p.Asp1327AspfsX87) and c.4013-4014 delCA (p.Ser1338Cysfs) heterozygous mutations, respectively, in the TSC2 gene. The parents of proband 1 had no abnormalities at these two loci; the mother of proband 2 had c.4013-4014 delCA heterozygous mutation in the TSC2 gene, while the father and the grandparents of proband 2 had no abnormalities. c.3981-3982 insA mutation may cause early coding termination of amino acid sequence at the 1413th site, and c.4013-4014 delCA mutation may cause early coding termination of amino acid sequence at the 1412th site. These two mutations are the pathogenic mutations for families 1 and 2, respectively, and both of them are novel frameshift mutations, but their association with the disease needs to be further verified by mutant protein function cell model and animal model.

[Chin J Contemp Pediatr, 2017, 19(3): 308-312]

Key words: Tuberous sclerosis complex; TSC2 gene; Frameshift mutation; Child

结节性硬化症(tuberous sclerosis complex, TSC)属于常染色体显性遗传的神经皮肤综合征, 发病率较低, 约1/6000~10000, 家族遗传约1/3^[1]。以多组织、多器官的错构瘤损害为主要特

征, 常可累及大脑、皮肤、心脏、肾脏、肺和眼等^[2]。临床表现各异, 且具有年龄相关性, 成人症状较儿童多, 但除心脏错构瘤外^[3]。其致病基因为TSC1和TSC2, 二者均属肿瘤抑制基因, TSC1

[收稿日期] 2016-10-25; [接受日期] 2016-12-10

[基金项目] 2015年度深圳市卫生计生系统科研项目/重点学科建设能力提升项目(201506062); 深圳市科技计划基础研究项目(JCYJ20150402090413001)。

[作者简介] 潘玉纯, 女, 硕士研究生。

[通信作者] 谢建生, 男, 教授。

基因位于9q34, 包含23个外显子, 第1和第2外显子分别为非编码区和选择性剪接位点, 编码产物为错构瘤蛋白(hamartin); TSC2基因位于16p13.3, 包含41个外显子, 编码产物为马铃薯蛋白(tuberin)。

TSC1和TSC2的致病突变包括无义突变、框移突变、剪接突变、缺失或插入和一些错义突变, 二者均无突变热点。临床诊断为TSC的患者约85%经测序可检测到突变。测序阴性者, 采用多重连接依赖性探针扩增技术(MLPA)检测大片段缺失和重排, TSC1和TSC2检出率分别为0.5%和6%^[4]。本文就TSC2基因两个新发框移突变作如下讨论。

1 资料与方法

1.1 研究对象

家系1先证者, 女, 4岁, 无缺氧窒息史, 母孕期无异常, 1岁半独走。生后2个月于面部右侧颞部发现一色素脱失斑(图1A)。生后6个月反复无诱因点头, 4~6次/d, 持续2~10 s/次。生后7个月颅脑MRI检查提示双侧侧脑室壁小结节灶及双侧大脑半球皮层下异常信号。1岁半复查CT提示双侧侧脑室壁边缘小结节灶较前有所增加(图1B), 双侧大脑半球皮层/皮层下小片状低密度灶, 部分伴钙化, TSC可能。脑电图异常, 清醒时双侧枕颞额大量尖慢波发放, 临床痉挛发作伴高幅慢波出现。双肾B超未见异常。2岁时面部可见少量血管纤维瘤, 逐渐增多。采集外周血送深圳华大基因研究院行TSC相关基因的高通量测序, 结果提示TSC2基因c.3981-3982 insA (p.Asp1327AspfsX87)杂合突变。经解痉、抗癫痫治疗, 现发作仍无减少, 睡醒时易发作, 有时玩耍中有张口、傻笑等动作, 心跳加快, 伴点头3~4次, 发作后疲劳入睡, 每天发作7~8次。有时继发双手僵硬, 双眼斜视, 喉中惊恐样发声, 1~2次/周。现只会叫“爸爸”“妈妈”两个词且吐字不清, 能听懂父母少部分话语, 但不能执行指令, 且有自闭症倾向。全身可见4处无规则色素脱失斑, 服用雷帕霉素后, 面部血管纤维瘤部分消退。先证者父母均无TSC相关症状。

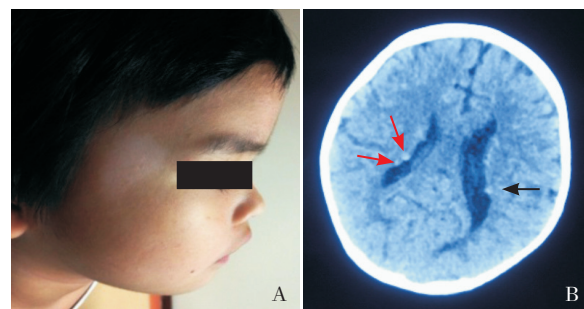


图1 家系1先证者皮肤改变和影像学特征 A: 右侧颞部一片状色素脱失斑; B: 1岁半头颅CT检查示右侧侧脑室旁2个点状高密度钙化灶(红色箭头所示), 左侧侧脑室旁可见1个点状高密度钙化灶(黑色箭头所示)。

家系2先证者, 女, 9岁, 出生史无异常, 两颊面部见散在血管纤维瘤, 腹部见钙化星形细胞错构瘤及小片状色素脱失斑。6岁时, 间断无诱因抽搐2次, 颅脑CT检查提示右侧侧脑室室管膜下见多发钙化灶影, 考虑TSC。脑电图提示为界限, 睡眠中见左侧中后颞区为主可疑尖波散发和睡眠背景欠佳。8岁时, 颅脑CT检查提示两侧侧脑室旁多发钙化(图2A), 癫痫大发作共3次, 双肾、心脏、肝、胆、胰、脾B超均未见异常。经抗癫痫治疗, 效果较好。外周血经华大基因行高通量测序, 结果提示为TSC2基因c.4013-4014 delCA (p.Ser1338Cysfs)杂合突变。现精神运动发育尚可, 学习成绩中上水平, 身高体重均处于同龄人水平。先证者母亲, 自幼面部可见对称性针尖样血管纤维瘤, 右侧腰部见钙化星形细胞错构瘤(图2B), 前胸、双上肢散在分布小片状色素脱失斑, 共4处。经家系一代测序验证, 先证者母亲亦存在TSC2基因c.4013-4014 delCA杂合突变。先证者父亲、外祖父母均无TSC相关症状。

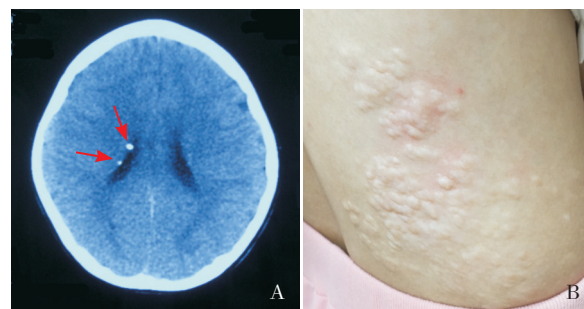


图2 家系2先证者影像学特征和先证者母亲皮肤改变 A: 先证者头颅CT检查示右侧侧脑室旁两个点状钙化灶(箭头所示); B: 先证者母亲右侧腰部钙化星形细胞错构瘤。

1.2 外周血基因组 DNA 提取

在知情同意的前提下,取家系 1、2 先证者、先证者父母和家系 2 先证者外祖父母外周血 2~3 mL, EDTA-K2 抗凝,采用 GentraPuregene Blood Kit (Qiagen 公司生产)试剂盒提取基因组 DNA,操作步骤按照说明书。检测 DNA 纯度和浓度 (Nanodrop2000 蛋白核酸分析仪),要求 DNA 纯度在 1.8~2.0 之间,浓度在 20~100 ng/μL 之间。

1.3 TSC 相关基因高通量测序分析

委托深圳华大临床检验中心将先证者 DNA 打断并制备文库,通过定制芯片对 TSC1 和 TSC2 目

标基因的编码区及邻近剪切区的 DNA 进行捕获和富集,最后使用高通量测序平台进行突变检测。检测基因目标区长度约 26579 bp,目标区覆盖度 95% 以上,目标区平均深度 509.58 ×,目标区平均深度 >30 × 位点所占比例为 100%。

1.4 引物设计

NCBI 查询 TSC2 基因序列 (NG_005895),根据高通量测序筛选出的突变位点,采用 Primer Premier 6.0 设计引物并由上海生工公司合成,引物序列见表 1。

表 1 TSC2 基因相应突变位点扩增引物

突变位点	上游引物	下游引物	引物长度 (bp)	退火温度 (°C)
c.3981-3982 insA	GTGGATGGCAGCAGTAAG	TGAGCAGAGGTATCAGCAT	493	54
c.4013-4014 delCA	GCTGATACCTCTGCTCAC	CTTAACCTCAGGGCTCAG	442	60

1.5 PCR 扩增

应用立陶宛 Thermo Scientific 公司试剂,反应体系: ddH₂O 15.5 μL, Buffer、Mg²⁺、dNTP 各 3 μL, 正反引物各 1 μL, Taq DNA 酶 1.5 μL, 模板 DNA 2 μL, 总体系为 30 μL。扩增条件: 96 °C 3 min 预变性; 94 °C 1 min 变性, 退火 1 min (相应退火温度见表 1), 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 3 min, 使 PCR 反应完全以提高扩增产量。取扩增产物 5 μL, TaKaRa 公司生产的 6 × Loading Buffer 1 μL, 混匀, 2% 琼脂糖 (Biowest Agarose) 凝胶电泳以验证产物特异性。

1.6 PCR 产物序列测定

取 PCR 扩增产物 25 μL, 用表 1 中 PCR 扩增引物作测序引物, 测序委托上海生工公司完成。具体步骤如下: PCR 产物纯化 (生工公司纯化试剂); 2% 琼脂糖凝胶电泳确认其纯度和浓度 (Biowest Agarose 琼脂糖粉, 生工公司的 marker); 根据 PCR 产物长度确定 DNA 模板浓度 (长度为 200~500 bp 的模板用量为 2~10 ng), DNA 测序反应 (ABI PCR 仪, 美国); 产物上机前用酒精纯化; 上测序仪 (ABI 3730XL); 采用 Chromas 软件分析数据。

2 结果

家系 1 先证者检出 TSC2 基因 c.3981-3982 insA (p.Asp1327AspfsX87) 杂合突变 (图 3), 先证者父母该位点均未见异常。该框移突变导致氨基酸序列在第 1413 位提前终止编码, 其致病性尚未见文献报道。家系 2 先证者、先证者母亲均检出 c.4013-4014 delCA (p.Ser1338Cysfs) 杂合突变 (图 4), 为母源性遗传, 先证者父亲、先证者外祖父母该位点均未见异常。该框移突变导致氨基酸序列在第 1412 位提前终止编码, 其致病性亦未见文献报道。

两突变在 HGMD 数据库 (www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php) 里未查出; 在千人基因组计划数据库中检出频率为 0; 在深圳华大基因收集的大于 200 例本地正常人测序样本中的发生频率为 A (发生频率 0~0.01 为 A; 0.01~0.05 为 B; 0.05~1 为 C); 用 Mutationtaster 软件 (www.mutationtaster.org/) 对其进行突变功能预测, 预测分数均为 1 (预测结果分数范围为 0~1, 分数越高提示致病可能性越大)。

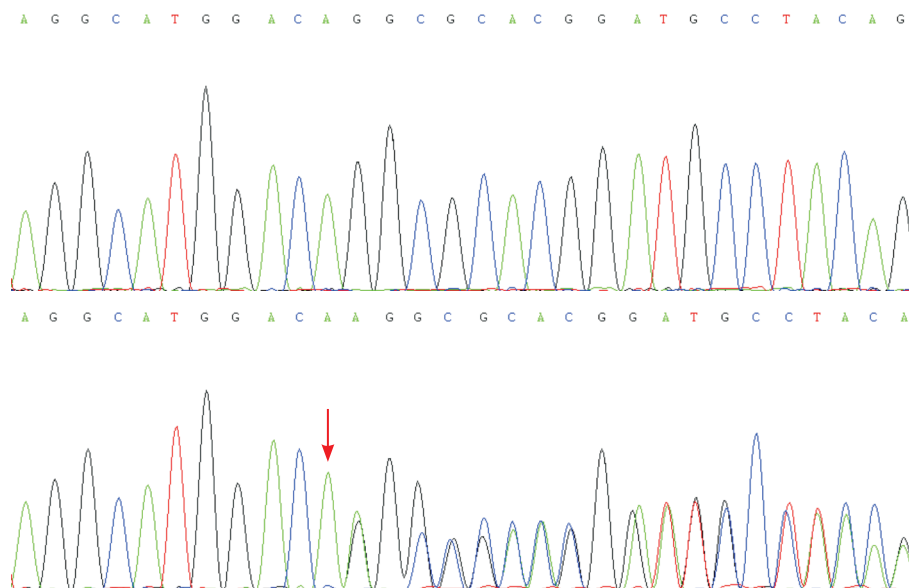


图3 TSC2 基因 c.3981-3982 insA 杂合突变测序结果 上图为正常对照，下图为先证者 c.3981-3982 insA 杂合突变，箭头所示为突变位点。

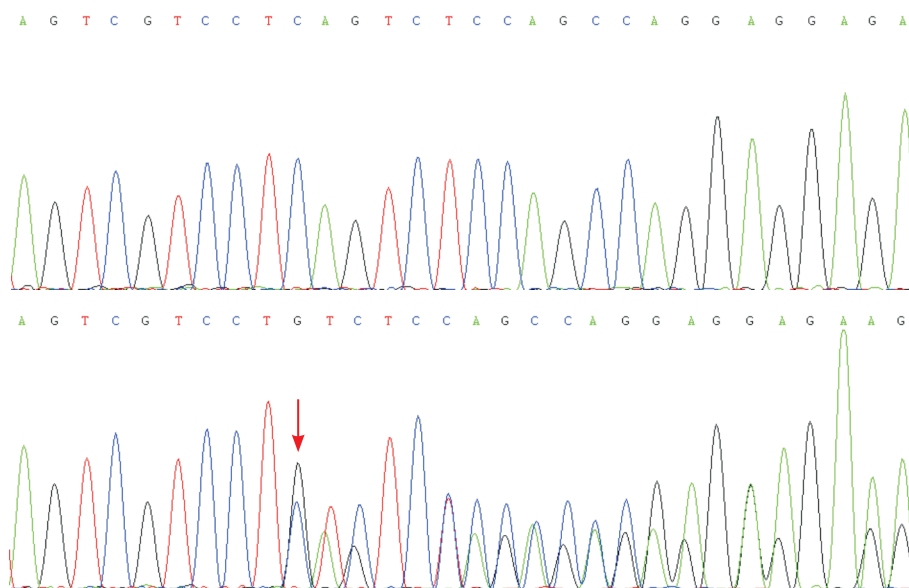


图4 TSC2 基因 c.4013-4014 delCA 杂合突变测序结果 上图为正常对照，下图为先证者 c.4013-4014 delCA 杂合突变，箭头所示为突变位点。

3 讨论

TSC1 编码的错构瘤蛋白和 TSC2 编码的马铃薯蛋白二者在细胞质内形成复合物，间接调控细胞增殖、细胞分裂和细胞黏附等，当任一基因发生突变时，胞内复合物形成受阻，对细胞增殖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^[5]。TSC1-TSC2 复合物在细胞中发挥作用是通过 TSC2 的 GAP 功能域（GTPase 激活蛋白）

间接激活哺乳动物雷帕霉素靶蛋白途径（mTOR），进而通过核糖体蛋白 S6 激酶（S6K）去磷酸化以达到抑制蛋白质合成、细胞生长、增殖和自我吞噬的作用^[6]。因此，TSC1-TSC2 复合物形成异常、TSC2 基因突变造成 GAP 域异常和 mTOR 磷酸化水平异常，均可出现 TSC 相关临床表现。TSC2 基因主要有两个功能域，即 Hamartin 结合域和 GAP 域^[7]，经 Swiss-prot 软件（www.uniprot.org/）在线查询可知 GAP 功能域位于第 1531~1758

位氨基酸,本研究讨论的TSC2基因c.3981-3982 insA (p.Asp1327AspfsX87)突变导致氨基酸序列在第1413位提前终止编码,c.4013-4014 delCA (p.Ser1338Cysfs)突变导致氨基酸序列在第1412位提前终止编码,二者均终止于GAP功能域前,导致GAP域全部缺失,为两家系的致病原因。

有不少国内外文献已报道错义突变、无义突变和框移突变导致GAP功能域异常,从而引发疾病。Mayer等^[8]曾报道1例临床症状较轻的TSC,发现TSC2基因c.4684G>A (G1556S),此错义突变位于GAP域内,导致非极性的甘氨酸变成极性的丝氨酸,抑制S6K磷酸化的能力减弱,引起信号通路异常而致病。Chen等^[9]在产前诊断中发现1例TSC2基因无义突变,即c.4830G>A (W1610X),此突变造成氨基酸编码发生提前终止,GAP功能域部分缺失,引起心脏横纹肌瘤和脑内异常等表现。Yu等^[10]报道1例致病性的缺失突变TSC2基因c.2690delT (p.Phe897SerfsX947),此框移突变导致GAP功能域完全缺失,引起一系列临床症状。

本研究讨论的TSC2基因c.3981-3982 insA、c.4013-4014 delCA在HGMD数据库(www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php)里未查出;在千人基因组计划数据库中检出频率为0;在深圳华大基因收集的大于200例本地正常人测序样本中的发生频率为A(发生频率0~0.01为A);用MutationTaster软件(www.mutationtaster.org/)对其进行突变功能预测,预测分数均为1(预测结果分数范围为0~1,分数越高提示致病可能性越大)。经过文献复习、氨基酸结构分析,结合先证者临床表现等,推测这两个框移突变为新发的致病性突变,但是突变蛋白功能仍需要细胞模型和动物模型的进一步验证,突变体结构需要X衍射等技术的检测。

TSC2基因大,致病突变数量多,嵌合型比例高,基因检测非常复杂。明确基因突变有助于TSC家系遗传咨询和利用分子遗传学方法进行早期产前诊断。Curatolo等^[11]在研究TSC基因型与表型的关系中阐明,TSC2突变引起的临床症状较TSC1更严重,如更易发生智力低下、癫痫、面部血管纤维瘤等。本研究中TSC2基因两突变先证者均有癫痫和面部血管纤维瘤表现,其中c.3981-3982 insA突变患儿临床表型严重,发病年龄较小,而c.4013-4014 delCA突变患儿表型较轻,智力发育正常。由于c.3981-3982 insA突变导致腺苷酸活化

蛋白激酶(AMPK)^[12]介导的磷酸化功能缺失,而c.4013-4014 delCA突变后此功能尚存在,因此推测这是TSC2基因c.3981-3982 insA突变较c.4013-4014 delCA表型严重的原因。

综上,本研究检出的TSC2基因c.3981-3982 insA、c.4013-4014 delCA突变为新发致病性框移突变,这两个新发突变的发现不仅丰富了基因突变谱,也为患病家系产前基因诊断提供了依据。

[参 考 文 献]

- [1] Huang CH, Peng SS, Weng WC, et al. The relationship of neuroimaging findings and neuropsychiatric comorbidities in children with tuberous sclerosis complex[J]. J Formos Med Assoc, 2015, 114(9): 849-854.
- [2] 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[J]. Jpn J Clin Oncol, 2014, 44(5): 506-511.
- [3] Kingswood JC, de Vries PJ. Tuberous sclerosis complex[J]. Paediatr Child Health, 2015, 25(10): 467-473.
- [4] Kozłowski P, Roberts P, Dabora S, et al. Identification of 54 large deletions/duplications in TSC1 and TSC2 using MLPA, and genotype-phenotype correlations[J]. Hum Genet, 2007, 121(3-4): 389-400.
- [5] De Waele L, Lagae L, Mekahli D. Tuberous sclerosis complex: the past and the future[J]. Pediatr Nephrol, 2015, 30(10): 1771-1780.
- [6] 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]. J Biol Chem, 2014, 289(18): 12195-12201.
- [7] Astrinidis A, Henske EP. Tuberous sclerosis complex: linking growth and energy signaling pathways with human disease[J]. Oncogene, 2005, 24(50): 7475-7481.
- [8] Mayer K. Characterisation of a novel TSC2 missense mutation in the GAP related domain associated with minimal clinical manifestations of tuberous sclerosis[J]. J Med Genet, 2004, 41(5): e64.
- [9] Chen CP, Su YN, Hung CC, et al. Novel mutation in the TSC2 gene associated with prenatally diagnosed cardiac rhabdomyomas and cerebral tuberous sclerosis[J]. J Formos Med Assoc, 2006, 105(7): 599-603.
- [10] Yu Z, Zhang X, Guo H, et al. A novel TSC2 mutation in a Chinese family with tuberous sclerosis complex[J]. J Genet, 2014, 93(1): 169-172.
- [11] Curatolo P, Moavero R, Roberto D, et al. Genotype/phenotype correlations in tuberous sclerosis complex[J]. Semin Pediatr Neurol, 2015, 22(4): 259-273.
- [12] Liu L, Pan Y, Song Y, et al. Activation of AMPK $\alpha 2$ inhibits airway smooth muscle cells proliferation[J]. Eur J Pharmacol, 2016, 791: 235-243.

(本文编辑: 邓芳明)