

# 结节性硬化患者基因型与脑电图和临床表现的关系

贺晶 周文静 史洁 林久奎 张冰清 孙朝晖

清华大学玉泉医院癫痫中心, 北京 100049

通信作者: 周文静, Email: closejeo@hotmail.com

**【摘要】目的** 探讨癫痫为主要临床表现的结节性硬化(TSC)患者的基因突变情况,并了解TSC患者的基因型与临床表型、头皮脑电图之间的关系。**方法** 2015年12月至2019年8月,对就诊于清华大学玉泉医院癫痫中心的43例临床表现为癫痫的TSC患者及家属进行了周围血液的提取,采用二代测序的方法对TSC基因进行检测,明确基因突变;并对所有患者进行头皮长程视频脑电图监测和磁共振检查,确定其发作起始区域、发作形式及致痫结节部位。**结果** 43例中39例有TSC基因突变,4例未检测出基因突变。其中11例为TSC1型,28例为TSC2型。22个基因突变为新生突变。TSC2型患者比TSC1型患者起病年龄早,结节数量更多,但是两者在智力方面和痉挛病史方面并未见明显差异。发作期头皮脑电图局灶性起始患者28例,其中TSC2型患者中头皮脑电图局灶性起源的比例较高,为24例,占85.7%。**结论** TSC2型患者往往起病年龄早,虽然磁共振表现为多个结节但是发作期脑电图起始往往为局灶性起源。

**【关键词】** 结节性硬化; 癫痫; TSC基因突变

DOI:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2020.02.011

## Analysis of genotypes, EEG and phenotypes of tuberous sclerosis complex patients

He Jing, Zhou Wenjing, Shi Jie, Lin Jiuluan, Zhang Bingqing, Sun Zhaohui

Department of Epilepsy Center, Tsinghua University Yuquan Hospital, Beijing 100049, China

Corresponding author: Zhou Wenjing, Email: closejeo@hotmail.com

**【Abstract】 Objective** Tuberous sclerosis complex (TSC) is a multi-system disease with TSC1 and TSC2 genes as the pathogenic genes. The purpose of our study was to analyze the gene mutation in patients with TSC with epilepsy as the main clinical manifestation. The relationship between genotype and phenotype, scalp EEG in patients was analyzed. **Methods** The peripheral blood was extracted from 43 patients and their families. TSC gene was detected by second-generation sequencing. Long-term video EEG monitoring and MRI examination were performed to determine the onset area, seizure type and location of nodules. **Results** 39 patients had TSC gene mutation, 4 patients did not detect the gene mutation. 11 had TSC1 mutations and 28 had TSC2 mutations. 22 mutations were de novo. Patients with TSC2 mutations had earlier seizure and more nodules than patients with TSC1 mutations, but no significant difference in intelligence and spasm were observed. 28 patients had focal origin of scalp EEG, of which 85.7% of TSC2 mutations patients had focal origin. **Conclusions** Patients of TSC2 mutations always has an early onset age. Although MRI shows multiple nodules, the onset of EEG is mainly focal origin.

**【Key words】** Tuberous sclerosis complex; Epilepsy; TSC gene mutation

DOI:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2020.02.011

结节性硬化(tuberous sclerosis complex, TSC)是由TSC1和TSC2基因突变导致的一种常染色体显性遗传性疾病,临床表现为面部血管纤维瘤、癫痫发作和智力低下,另外还有心脏、肾脏和肺等多脏器受累,发病率为1/6 000~1/10 000<sup>[1]</sup>。根据致病

基因的不同,将TSC分为TSC1型和TSC2型。TSC1基因和TSC2基因均为肿瘤抑制基因,若TSC1基因或TSC2基因发生突变,使mTOR复合物1(mTOR complex 1, mTORC1)信号转导通路异常激活,导致TSC的发生<sup>[2]</sup>。TSC主要临床表现为癫痫的患者经

常为药物难治性癫痫<sup>[3]</sup>,TSC 的临床表现和基因类型多种多样<sup>[4-5]</sup>。尽管已经有大量关于 TSC 基因型与临床表型之间的关系的研究,但是基因型与癫痫临床表型之间的关系仍不明确,甚至有些研究结果不一致,互相矛盾<sup>[6]</sup>。另外,虽然基因型与临床表型之间的研究比较多,但是 TSC 基因型与癫痫患者脑电图之间的关系研究并不多见。

## 对象与方法

1. 对象:收集 2015 年 12 月至 2019 年 8 月就诊于清华大学玉泉医院癫痫中心的 43 例主要表现为癫痫的 TSC 患者,其中男 24 例,女 19 例。起病年龄为出生后 3 d~11 岁,平均 13.3 个月。就诊年龄为 7 个月~29 岁,癫痫病史 7 个月~18 年。43 例患者均进行 3 种以上的>10 个月的药物治疗,均为难治性癫痫。

2. 方法:采用国际标准 10-20 系统长时间视频采集脑电图,每例患者均进行了惯常发作监测,明确发作起源区域,确定发作类型。监测时间 1~7 d,共发作 2~20 次。癫痫确定和分类根据 2017 年国际抗癫痫联盟(ILAE)定义<sup>[7]</sup>。所有患者均实施磁共振扫描。对患者的临床资料如起病年龄、智力情况、痉挛病史、发作类型及磁共振情况均进行了详细的分析。

对所有患者及家属进行抽血进行全外显子组测序。基因检测:(1)检测方法:采用全外显子组测序,基于 Illumina 技术测序平台,采用 Agilent SSELXT Human All Exon V6 进行捕获建库,双末端(Paired-End)测序策略。Raw data>10G,Q30>80%。(2)生物信息分析与变异筛选流程:测序仪下机原始数据使用 bcl2fastq 将 .bcl 转换成 .fastq 文件,并使用 BWA, Samtools 和 Picard 软件将 reads 比对到人类参考基因组 GRCh38/hg38,生成的 .bam 文件采用 GATK 系列软件进行局部重新比对,重复序列去除并进行变异检出。使用 Annovar 对 .vcf 变异文件进行变异注释。根据美国医学遗传学与基因组学学会(ACMG)分类指南以及患者的临床表型进行致病变异的筛选。使用二代测序技术检出的与患者临床表型相关的致病变异位点会采用一代 Sanger 测序技术进行验证,如果有双亲样本也会

同时进行验证。

3. 统计学分析方法:采用 SPSS 25.0 软件行数据分析。计数资料用例(%)表示,组间比较用 Fisher 精确概率检验,检验水准为 0.05。

## 结 果

1. 基因突变检测结果:43 例中 39 例(90.7%)检测出 TSC 基因突变,4 例(9.3%)未检测出基因突变。39 例 TSC 基因突变患者中 11 例为 TSC1 基因突变,占 28.2%;28 例为 TSC2 基因突变,占 71.8%;22 例患者基因突变为新生突变,占 51.2%。

2. 头皮脑电图:43 例中 42 例在实施长程视频脑电图中监测到了临床发作。发作期脑电图起始形式分为局灶性起源和非局灶性起源。43 例头皮脑电图间歇期均为多脑区性或者全面性分布。30 例发作期脑电图为局灶性起源(图 1)。28 例 TSC2 型患者发作脑电图局灶性起源占 24 例(85.7%),其余 4 例为全面性起源。11 例 TSC1 型发作脑电图局灶性起源的占 4 例,其余 5 例患者为全面性起源,2 例脑电图既有全面性起源又有局灶性起源。未发现基因突变患者中局灶性起源的患者有 2 例(66.7%),1 例为全面性起源,差异有统计学意义, $P<0.05$ 。在所有局灶性起源的患者中发作起始区域 14 例起始于额中央区,8 例起始于后头部区域,1 例起始于颞区,4 例起始于前头部,3 例起始于一侧半球。

3. 临床表现:31 例为 1 岁之前起病(包括 1 岁),占 72.1%;9 例为 1~3 岁起病(包括 3 岁),占 20.9%;3 例为 3 岁之后起病,占 7.0%。TSC2 型患者平均起病年龄为 6.6 个月,TSC1 型患者平均起病年龄为 11.6 个月。起病年龄最大患者 11 岁,未发现其基因突变。统计学分析表明,三者起病年龄分组中

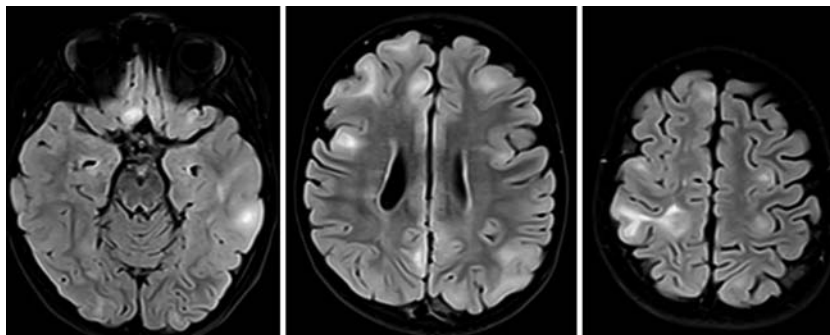


图 1 1 例结节性硬化 TSC2 新生突变患者的磁共振检查情况 3 幅图均为 T2flair 结果(层厚 3 mm),显示双侧脑区多处结节,可见双侧额叶、双侧顶叶、双侧中央叶、左侧颞叶及右侧额眶部多处高信号

差异无统计学意义,  $P>0.05$ , 但是 TSC2 型患者起病年龄均在 3 岁之前(表 1)。

按患者癫痫发作频率分为 3 组, 即: 数十次/d、数次/d 及  $\leq 1$  次/周, 三者发作频率差异有统计学意义,  $P<0.001$ ; TSC2 型基本上发作频率为数次/d, TSC1 型和未见基因突变患者在 3 组中无明显差异。43 例患者在出现癫痫症状前智力运动发育均为正常, 在患癫痫后仅 5 例智力发育正常, 其余均有不同程度的落后, 在智力方面 3 组差异无统计学意义 ( $P>0.05$ )。

43 例患者中 17 例有痉挛病史, 其中 14 例曾经有痉挛病史, 就诊时已经转为其他的发作类型; 在痉挛病史方面 3 组差异无统计学意义,  $P>0.05$ 。有 3 例就诊时仍为痉挛发作, 3 例就诊时年龄分别为 4 个月, 3 岁 4 个月和 1 岁 7 个月。14 例患者起病年龄均在 10 个月以下。15 例患者中 TSC2 基因突变的更多见, 为 11 例, 占 73.3%; TSC1 基因突变的少见, 为 4 例, 占 26.6%; 未发现基因突变 2 例, 占 13.3%。

TSC2 型患者中 9 例为强直发作, 2 例为动作停止, 4 例为过度运动发作, 2 例为自动症发作, 2 例为阵挛发作, 1 例为强直-阵挛发作, 1 例为感觉性发作和强直发作, 1 例为强直发作和情绪性发作, 1 例为负性运动性发作, 1 例为强直和过度运动发作, 1 例为强直-阵挛发作, 3 例为不能分类发作。TSC1 型

患者中 4 例为强直发作, 3 例为痉挛发作, 2 例为过度运动发作, 2 例为自动症发作。未发现基因突变中有 3 例患者监测到了发作, 其中 2 例为自动症发作, 1 例为强直发作。

4. 影像学情况: 43 例患者磁共振检查结果均有结节(图 2), 对结节数量和结节部位进行统计后发现, TSC1 的结节数量较少, 共 95 个, 平均 8.6 个; TSC2 的结节数量共 720 个, 平均 25.7 个。未发现基因突变的结节数量共 46 个, 平均 11.5 个(表 2)。TSC2 的结节数量远远多于其他两种突变类型。将结节部位按照脑叶分为额叶结节、颞叶结节、中央叶结节、枕叶结节、岛叶结节及顶叶结节, TSC1 和 TSC2 部位都为额叶结节较多(表 2)。

表 2 结节性硬化患者核磁检查结节情况

结节部位	数量(例)			合计 [例(%)]
	TSC2 基因突变	TSC1 基因突变	未发现基因突变	
额叶	301	43	32	376(43.7)
颞叶	133	22	4	159(18.5)
顶叶	140	19	8	167(19.4)
枕叶	51	3	0	54(6.3)
岛叶	9	1	1	11(1.3)
中央叶	86	7	1	94(10.9)
合计	720	95	46	861(100)

表 1 结节性硬化患者临床情况与基因突变关系

基本情况	数量(例)			合计 [例(%)]	P 值
	TSC2 基因突变	TSC1 基因突变	未发现基因突变		
起病年龄(岁)					0.074
≤1	21	8	2	31(72.1)	
1~3	7	1	1	9(20.9)	
>3	0	2	1	3(7.0)	
脑电图起始					0.004
非局灶性	4	7	1	12(27.9)	
局灶性	24	4	2	30(70.0)	
发作频率					0.001
数 10 次/d	1	5	0	6(14.0)	
数次/d	25	3	3	31(72.1)	
<1 次/周	2	3	1	6(14.0)	
智力情况					1
正常	4	1	0	5(11.6)	
差	24	10	4	38(88.4)	
痉挛					1
是	11	4	2	17(39.5)	
否	17	7	2	26(60.5)	

注: 非局灶性包括 10 例全面性起源患者以及 2 例全面性起源、局灶性起源均有的患者

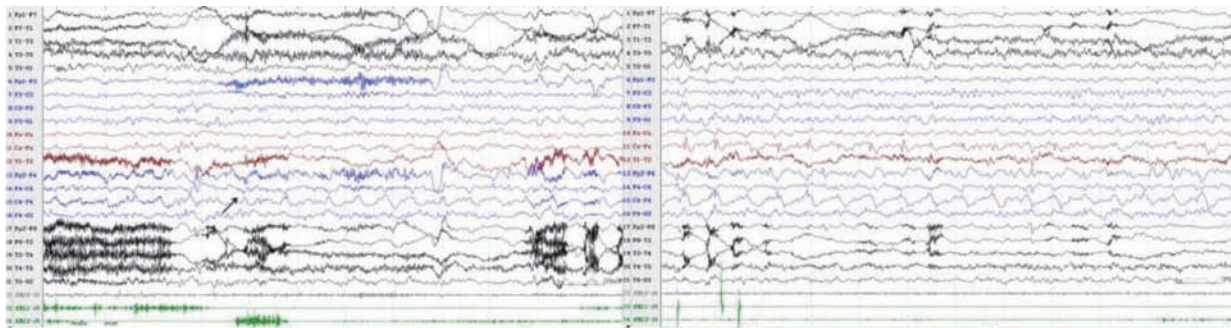


图2 1例TSC2基因突变患者的脑电图结果,发作期起始为右侧中央、顶区低波幅节律性慢波起始,箭头为脑电图起源部

## 讨 论

癫痫经常是TSC患者来医院就诊的主要原因。癫痫作为TSC的主要症状,对患者及家庭造成了很大的负担。虽然TSC基因型和临床表型之间的关系相关研究的报道多见,但是基因型与癫痫患者脑电图之间的关系相关研究报道较少。

据报道,TSC2基因突变数量比TSC1基因突变数量多,大概为5倍<sup>[8]</sup>,但本研究发现,TSC2基因突变数量为TSC1基因突变数量的2.5倍,以后随着病例数量的增加会总结出更为准确的数据。据报道,80%患者3岁前发病,67%患者1岁前发病<sup>[9]</sup>。本研究结果与文献报道大体一致。

有文献报道,40%~70%患者有智力落后<sup>[10]</sup>,也有报道智力损伤在50%的患者中<sup>[9]</sup>。本组43例患者在起病前均为智力正常,但是癫痫发病后仅有5例智力正常,其原因可能是长期癫痫发作导致的智力障碍,所以在疾病早期尽早控制癫痫是控制智力落后的主要措施。有文献报道TSC2型比TSC1型的认知下降更明显<sup>[10]</sup>。本研究表明,在智力方面TSC2型和TSC1型无明显差异。5例智力正常的患者为无义突变,突变类型是否与智力发育有关,目前尚未见相关报道。

在以往的多篇文献报道中TSC2型比TSC1型临床表现更严重<sup>[11-13]</sup>。本研究发现,TSC2型的平均起病年龄比TSC1的平均起病年龄小,但是TSC2型和TSC1型的智力及痉挛方面差异无统计学意义,TSC2型比TSC1型临床表现严重的机制目前仍不清楚,推测可能是TSC1和TSC2基因编码的物质不同,从而导致调控mTOR通道有所差异。TSC2基因突变很有可能使mTOR通道更活跃从而导致临床表现更严重<sup>[12]</sup>。尽管分子机制的研究已有较大进展,但是基因型和临床表型之间的关系还是不清楚<sup>[11,14]</sup>,目前还是不能根据基因型推测出临床

表现<sup>[15]</sup>。

TSC1型中发作期脑电图全面性起源居多,分析原因可能是发作经常独立起始于多个皮层结节。虽然TSC2型比TSC1型结节数量多,但是TSC2型比TSC1型发作期脑电图更局灶,目前机制不清楚<sup>[12]</sup>。TSC癫痫发作以额中央区起始多见<sup>[16]</sup>,本组的例数虽然比较少,但是还是发现局灶性起始的患者主要以额中央区多见。

由于TSC患者的磁共振检查表现为多个结节,磁共振和脑电图并不是一一对应的关系,即使磁共振为1个结节的患者,间歇期放电仍为多脑区性或者全面性。Jacobs等<sup>[17]</sup>研究结果显示,结节深部的白质有异常,推测有很多小的结构异常,造成网络连接异常。

总之,TSC2型患者比TSC1型患者起病更早。TSC2基因突变患者发作期脑电图以局灶性起源为主。TSC患者智力差是由于长期癫痫发作导致,和基因类型关系不大。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

## 参 考 文 献

- [1] Crino PB, Nathanson KL, Petri Henske E. The tuberous sclerosis complex [J]. *N Engl J Med*, 2006,355(13):1345-1356. DOI: 10.1056/NEJMra055323.
- [2] van Slegtenhorst M, Nellist M, Nagelkerken B, et al. Interaction betweenhamartin and tuberlin, the TSC1 and TSC2 gene products[J]. *Hum Mol Genet*, 1998,7(6):1053-1057. DOI: 10.1093/hmg/7.6.1053.
- [3] Krsek P, Jahodova A, Kyncl M. Predictors of seizure-free outcome after epilepsy surgery for pediatric tuberous sclerosis complex[J]. *Epilepsia*, 2013,54(11):1913-1921. DOI: 10.1111/epi.12371.
- [4] Davis PE, Filip-Dhima R, Sideridis G, et al. Presentation and diagnosis of tuberous sclerosis complex in infants[J]. *Pediatrics*, 2017,140(6): e20164040. DOI: 10.1542/peds.2016-4040.
- [5] Yu T, He Y, Li N, et al. Novel TSC1 and TSC2 gene mutations in Chinese patients withtuberous sclerosis complex[J]. *Clin Neurol Neurosurg*, 2017, 154: 104-108. DOI: 10.1016 / j.clineuro.2017.01.015.

- [6] Curatolo P, Moavero R, Roberto D, et al. Genotype/Phenotype Correlations in Tuberous Sclerosis Complex[J]. *Semin Pediatr Neurol*, 2015, 22(4): 259-273. DOI: 10.1016 / j.spen.2015.10.002.
- [7] Scheffer IE, Berkovic S, Capovilla G, et al. ILAE classification of the epilepsies: Position paper of the ILAE Commission for Classification and Terminology[J]. *Epilepsia*, 2017, 58: 512-521. DOI: 10.1111/epi.13709.
- [8] Nellist M, Brouwer RW, Kockx CE, et al. Targeted Next Generation Sequencing reveals previously unidentified TSC1 and TSC2 mutations[J]. *BMC Med Genet*, 2015, 16: 10. DOI: 10.1186/s12881-015-0155-4.
- [9] Curatolo P, Moavero R, de Vries PJ. Neurological and neuropsychiatric aspects of tuberous sclerosis complex[J]. *Lancet Neurol*, 2015, 14(7): 733-745. DOI: 10.1016/S1474-4422(15)00069-1.
- [10] Jansen FE, Vincken KL, Algra A, et al. Cognitive impairment in tuberous sclerosis complex is a multifactorial condition[J]. *Neurology*, 2008, 70(12): 916-923. DOI: 10.1212 / 01.wnl.0000280579.04974.c0.
- [11] 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[J]. *Am J Hum Genet*, 2001, 68(1): 64-80. DOI: 10.1086/316951.
- [12] Kothare SV. Severity of manifestations in tuberous sclerosis complex in relation to genotype[J]. *Epilepsia*, 2014, 55(7): 1025-1029. DOI: 10.1111/epi.12680.
- [13] Bai, D, Zhao, J, Li, L, et al. Analysis of genotypes and phenotypes in Chinese children with tuberous sclerosis complex[J]. *Sci China Life Sci*, 2017, 60(7): 763-771. DOI: 10.1007/s11427-017-9091-x.
- [14] Sancak O, Nellist M, Goedbloed M, et al. Mutational analysis of the TSC1 and TSC2 genes in a diagnostic setting: Genotype-phenotype correlations and comparison of diagnostic DNA techniques in Tuberous Sclerosis Complex[J]. *Eur J Hum Genet*, 2005, 13(6): 731-741. DOI: 10.1038 / sj.ejhg.5201402.
- [15] Peron A, Au KS, Northrup H. genomics, and genotype-phenotype correlations of TSC: insights for clinical practice[J]. *Am J Med Genet*, 2018, 178(3): 281-290. DOI: 10.1002/ajmg.c.31651.
- [16] Savini MN, Mingarelli A, Vignoli A, et al. Ictal signs in tuberous sclerosis complex: clinical and video-EEG features in a large series of recorded seizures[J]. *Epilepsy Behav*, 2018, 85: 14-20. DOI: 10.1016/j.yebeh.2018.05.027.
- [17] Jacobs J, Rohr A, Moeller F, et al. Evaluation of epileptogenic networks in children with tuberous sclerosis complex using EEG-fMRI[J]. *Epilepsia*, 2008, 49(5): 816-825. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2007.01486.x.

(收稿日期: 2019-07-12)

(本文编辑: 刘小梅)

## ·消息·

## 关于开展聚普瑞锌颗粒剂有奖征文的通知

征文背景: 聚普瑞锌颗粒剂是2012年获得国家药监局批准的新药, 其为胃黏膜保护药物, 适用于治疗各种原因所致胃黏膜损伤性疾病。吉林省博大伟业制药有限公司联合中华医学杂志特向全国征集聚普瑞锌颗粒剂相关的临床应用典型病例、临床观察、综述、基础研究、不良反应等文章。欢迎全国从事消化科、心内科、肿瘤科等领域的同道踊跃投稿。

征文目的: 促进我国医学学科繁荣发展, 搭建不同学科学术思想融合, 产学研结合转化, 为医学发展服务, 为医、患服务的综合交流平台, 不断推动医学进步与创新, 提高医务工作者的诊治水平, 最终保障人民健康和生命安全。

现将征文有关事项通知如下:

一、交流内容包括: (1) 药物的有效性; (2) 药物相关机理探索; (3) 药物的安全性; (4) 药物的剂量相关; (5) 其他与药品相关的学术内容。

二、征文要求: (1) 未在国内公开刊物上发表的论文; (2) 全文一份, 5 000 字以内, 编排顺序为: 题目、姓名、单位、

邮政编码、正文; (3) 摘要一份, 1 000 字以内, 编排顺序为: 题目、姓名、单位、邮政编码、正文。摘要正文格式必须包括: 目的、方法、结果和结论; (4) 典型病例需叙述完整, 包括但不限于病史、检查、诊断、治疗方案、疗效, 用药合理; (5) 文章内容应符合本次征文专业范围要求, 要体现先进性、科学性; (6) 文章撰写格式要求, 请登陆《中华医学杂志》官方网站(<http://www.nmjc.net.cn>) 查阅稿约。

三、格式和时间: 本次征文只接受 Email 投稿, 投稿时间为: 即日起至2020年5月30日。请作者自留底稿, 文责自负。投稿接收邮箱: rlsyjjw2019@163.com, 请注明聚普瑞锌颗粒剂征文。

四、论文评奖及发表: 主办方将组织专家对投稿论文进行评审, 评选出优秀论文一、二、三等奖, 并将颁发获奖证书及奖金。其中一等奖1名, 奖金10 000元; 二等奖2名, 奖金各5 000元; 三等奖5名, 奖金各3 000元。对于优秀论文将推荐给《中华医学杂志》编辑部, 审核通过的征文, 将在《中华医学杂志》相关栏目刊出。