

方法。治疗上,应及时停用可疑肝损伤药物、根据 DILI 类型选用保肝药物、重症必要时选择肝移植^[9-10]。该患者否认既往肝病病史,为治疗 HL,先后使用了 ABVD、ICE 及 PD-1 方案化疗。根据用药先后顺序与肝病因果关系,ICE 方案中的依托泊苷、卡铂、异环磷酰胺为重点可疑药物。但是,根据国家医学中心数据库治疗方案相关性分析,ICE 方案为 C~D 级,评估为可能或可能性较小。ABVD 方案中的长春新碱、吡柔比星、博来霉素、达卡巴嗪虽不能完全排除嫌疑,但使用时间与肝病发病间隔较长,可能性较小,而后期使用的 PD-1 方案不具备作案时间。结合目前肝损伤程度不重,建议保肝治疗的同时,继续 PD-1 方案+DHAP(减量)化疗+G-CSF 动员。

根据 MTD 讨论结果,在保肝治疗及监测肝功能的同时,完成自体骨髓干细胞移植等一系列淋巴瘤的治疗,为患者争取良好的转归。通过该病例的诊治,分析跨学科肝损伤的原因是多元的,常规检验甚至肝脏病理检查仍不能确定病因时,突显了 MDT 共同攻克难题的重要性。临床医学本是经验性学科,只有不断积累经验,建立立体诊疗思维体系,提高临床医生对复杂病情的综合分析能力,才能提高对疑难疾病的诊治水平。

参考文献

[1] 李飞,陆伦根. 肝功能异常的评估以及相关肝病的诊断思路[J]. 胃肠病学,2018,23(5):305-308.

[2] 何志颖,赵新颖. 肝组织病理学检查在不明原因肝病诊治中的应用[J]. 实用肝脏病杂志,2018,21(1):10-13.

[3] 刘松涛,李娟,于卫红,等. 9 例以肝功能异常起

• 短篇及病例报道 •

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.19.028

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20230505.1310.034\(2023-05-05\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20230505.1310.034(2023-05-05))

病的恶性淋巴瘤患者临床特征分析[J]. 实用肝脏病杂志,2020,23(5):650-653.

[4] MONILL J,PERNAS J,MONTSERRAT E,et al. CT features of abdominal plasma cell neoplasms[J]. Eur Radiol,2005,15(8):1705-1712.

[5] CZAJA A J. Cryptogenic chronic hepatitis and its changing guise in adults[J]. Dig Dis Sci,2011,56(12):3421-3438.

[6] PENG Y,QING A C,CAI J,et al. Lymphoma of the liver:clinicopathological features of 19 patients[J]. Exp Mol Pathol,2016,100(2):276-280.

[7] CHALASANI N P,MADDUR H,RUSSO M W,et al. Practice parameters committee of the American college of gastroenterology. ACG clinical guideline: diagnosis and management of idiosyncratic drug-induced liver injury[J]. Am J Gastroenterol,2021,116(5):878-898.

[8] 国家感染性疾病临床医学研究中心. 肝内胆汁淤积症诊治专家共识(2021 年版)[J]. 中华肝脏病杂志,2022,30(2):137-146.

[9] SHEN T,LIU Y,SHANG J,et al. Incidence and Etiology of Drug-Induced Liver Injury in Mainland China[J]. Gastroenterology,2019,156(8):2230-2241.

[10] DEVARBHAVI H,AITHAL G,TREEPRASE RTSUK S,et al. Drug-induced liver injury:Asia Pacific association of study of liver consensus guidelines[J]. Hepatol Int,2021,15(2):258-282.

(收稿日期:2023-02-07 修回日期:2023-05-30)

(编辑:张芃捷)

I 型神经纤维瘤病相关的新的移码突变病例报道及文献复习

刘睿钦¹,孟华星²,侯佳琪¹,张美妮^{2△}

(1. 山西医科大学第一临床医学院,太原 030001;2. 山西医科大学第一医院神经内科,太原 030001)

[关键词] I 型神经纤维瘤病;移码突变;全外显子测序;分子模型;致病性鉴定

[中图法分类号] R741 [文献标识码] B [文章编号] 1671-8348(2023)19-3036-05

神经纤维瘤病是一种罕见的基因突变引起的常染色体显性遗传病,影响神经、肌肉、骨骼、内脏器官、皮肤和其他系统,神经系统肿瘤是该病的特征表现,最常见

的类型是 I 型神经纤维瘤病(neurofibromatosis 1,NF1)和 II 型神经纤维瘤病。NF1 占 85%~90%,其特征是神经纤维瘤、咖啡斑、雀斑和视神经胶质瘤。II 型神经

纤维瘤病主要表现为双侧前庭神经鞘瘤和脑膜瘤^[1]。

NF1 的发病率为 1/3 000~1/2 000, 患者容易发生中枢神经系统和外周神经系统的良性和恶性肿瘤, 与该疾病相关的神经系统肿瘤包括视神经胶质瘤、胶质母细胞瘤、恶性周围神经鞘瘤和横纹肌肉瘤等。患者的预期寿命约比健康人少 15 年, 主要死亡原因是恶性肿瘤、心血管意外和脑卒中^[2]。该病尚无根治手段, 主要是对症治疗, 因此, 完善基因检测对于早期诊断和预防家系遗传有重要意义。

NF1 基因于 1990 年被发现, 该肿瘤抑制基因位于 17q11.2 染色体上, 包含 58 个外显子, 编码神经纤维蛋白。神经纤维蛋白抑制 RAS 信号传导通路, 对细胞增殖起负调节作用。*NF1* 基因缺陷患者缺乏正常功能的神经纤维蛋白, 导致 RAS 通路不受控制的增殖, 并形成一系列肿瘤综合征。目前, 文献中报道了 3 000 余个 *NF1* 基因的不同致病突变位点^[3]。

全基因组测序正越来越广泛地用于诊断 I 型神经纤维瘤病, 鉴于其在 *NF1* 基因缺陷临床诊断和预防中的价值, 本文报道了一种通过这种方法鉴定的新移码变体, 以填补基因库空白, 有助于基因咨询及产前诊断, 提高临床诊断率。

1 临床资料

1.1 临床数据收集

从先证者、先证者的父母、叔叔、姑姑、堂妹、祖父及其父母和兄弟姐妹采集了详细的病史, 并对他们进行了标准的神经系统查体。先证者完善血常规、肝肾功、电解质、风湿系列抗体、甲状腺功能化验及颅脑、颈髓、胸髓磁共振检查。先证者完善全基因组二代测序, 先证者及其父母完成 Sanger 测序。此研究经山西医科大学第一医院伦理委员会批准[批号[2022]伦审字(S016)号], 相关人员签署知情同意书。

1.2 全基因组测序和生物信息学分析

对 DNA 进行测序, 以发现致病基因。使用基因组分析工具包(www.broadinstitute.org/gatk)筛选单核苷酸多态性。变异用 ANNOVAR(ANNOVAR.openbiology.org/en/late/)注释。

1.3 Sanger 测序和保守性分析

Sanger 测序验证全基因组测序发现的候选致病基因, 并在家系中进行共分离分析。引物由 Primer Premier 5.0 (Premier Biosoft, 美国) 设计, PCR 在 LifeECO Thermal Cycler TC-96/G/H (b) C (Bioer Technology, 中国) 上进行, 以扩增覆盖突变位点的片段。PCR 产物通过琼脂凝胶电泳进一步纯化, 然后在 ABI 3730XL DNA 测序仪 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) 上测序。Sanger 测序结果通过 Chromas Lite v2.01 (Technelysium, Tewantin,

Queensland, Australia) 进行分析。

为评估突变位点的进化保守性, 我们使用同源基因比对了对不同动物物种的神经纤维蛋白序列。

1.4 变量建模

使用 SWISS-MODEL(https://www.swissmodel.expasy.org) 模拟野生型和突变蛋白的三维结构。随后, 用 PyMOL 分析氨基酸变化对蛋白质分子结构的影响。

2 结 果

2.1 临床表现

先证者是一名 9 岁女孩, 主因“发现牛奶咖啡斑 9 年”就诊。既往史无特殊。个人史系第一胎足月剖宫产, 母亲孕期平顺, 出生时一般状况良好, 腋窝、腹股沟、胸部、腹部和背部有咖啡色斑点(图 1), 言语发育迟缓, 多动、注意力不集中, 学习成绩中下。神经系统专科查体: 神志清楚, 言语欠流利, 理解力、计算力、定向力可, 注意力差, 查体合作。患者颅神经、肌力、肌张力、腱反射正常, 病理反射阴性, 感觉和共济查体正常。实验室检查: 血常规嗜酸性血液粒细胞的绝对值为 $0.00 \times 10^9/L$, 糖化血红蛋白为 4.77%, 甲状腺抗过氧化物酶抗体 37.57 IU/mL, 肝功能白蛋白 39.4 g/L, 肌酐 $40.7 \mu\text{mol/L}$, 尿酸 $465 \mu\text{mol/L}$ 。尿常规、便常规、凝血系列和风湿系列抗体检验均未见异常。腰椎穿刺示脑脊液生化、常规无异常。颅脑、颈椎和胸椎磁共振平扫及增强成像、颅脑磁共振波谱和灌注加权成像均未见异常。本院裂隙灯检查未见 Lisch 结节。

患者家系谱图如图 2 所示, 世代由 I、II、III 和 IV 表示。正方形代表男性, 圆形代表女性。黑色代表表现出牛奶咖啡斑的家系成员。先证者 IV-1 由箭头指示。家系成员 II-2 在儿童时期死于肺炎。*NF1* 家系来自山西省。家系 3 代有 5 例患者。先证者(IV-1)的祖父、父亲、叔叔和堂妹都出现了类似的牛奶咖啡斑, 未见神经纤维瘤及其他系统肿瘤、Lisch 结节及特异性骨损伤。先证者母亲及其直系亲属未见牛奶咖啡斑。

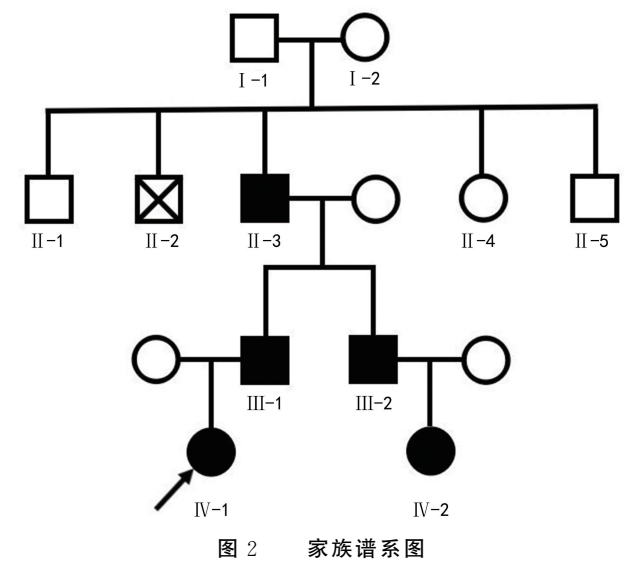
2.2 全外显子组测序和生物信息学分析

本研究进行了全基因组测序和生物信息学分析, 以准确定位该基因, 并对先证者 IV-1 进行了全基因组测序, 靶区覆盖率大于 99.80%, 靶区平均深度为 120.060X, 靶区 20X 覆盖率大于 99.50%。在外显子水平的样本中未发现与疾病相关的明显拷贝数变异。在先证者 IV-1 的 *NF1* 基因第 38 位外显子中发现了一个移码突变, c.5600delT(p.I1867Tfs*6) 碱基缺失将神经纤维蛋白的 1 867 位氨基酸从异亮氨酸变为苏氨酸, 并提前引入了一个终止密码子, 将神经纤维蛋

白从 2 818 个氨基酸截断为 1 871 个氨基酸。



图 1 先证者 IV-1 全身多处牛奶咖啡斑



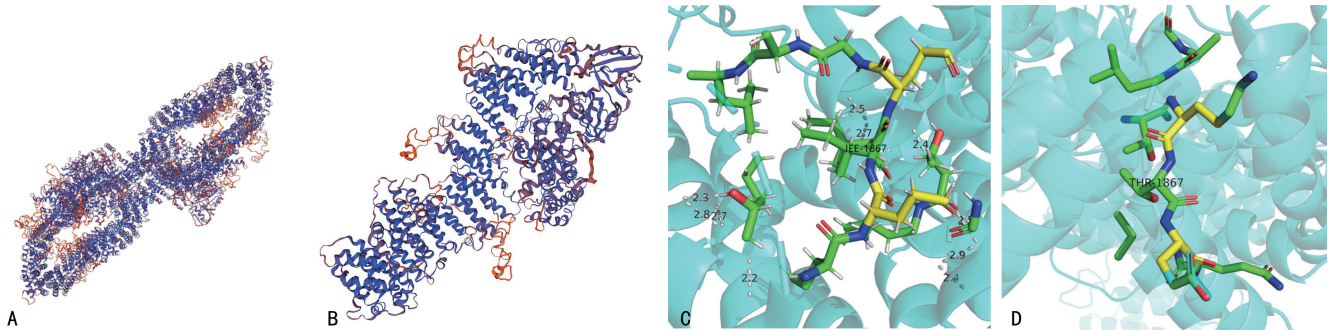
2.3 Sanger 测序确认

先证者和她的父亲表现出牛奶咖啡斑,他们的 NF1 基因中都有移码突变 (c. 5600delT chr17: 29657367),母亲未表现出临床症状,也没有发现任何突变。在 200 名无关的汉族人对照中,没有发现任何突变。

2.4 变量建模

应用 SWISS-MODEL 模拟神经纤维蛋白,笔者从 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org>) 中选择了 7PGT 模型,这是相似度最高的模型,显示出与神经纤维蛋白 74% 的一致性,正常蛋白如图 3A 所示。此外,将神经纤维蛋白的第 1 867 位氨基酸从异亮氨酸变为苏氨酸,并用 Chimera 软件在第 1871 位截断该蛋白,然后使用 SWISS-MODEL 构建突变蛋白模型,如图 3B 所示。该模型显示神经纤维蛋白缺失 947 个氨基酸并失去其正常结构。

应用 PyMOL,笔者在正常蛋白和突变蛋白中的第 1 867 位氨基酸寻找 6Å 范围内的氨基酸分子,并寻找原子之间的氢键。如图 3C 所示,正常蛋白质在异亮氨酸氨基酸周围有较多的氨基酸,形成 11 对氢键;如图 3D 所示,突变蛋白在苏氨酸氨基酸周围的氨基酸较少,并未发现氢键。笔者推测,p. I1867Tfs * 6 变体改变了氨基酸 1867 周围的分子间相互作用,并截断了 947 个氨基酸,这影响了神经纤维蛋白的构象和稳定性,从而影响了正常的生物学功能。



A:SWISS-MODEL 构建的正常蛋白;B:SWISS-MODEL 构建的突变蛋白;C:PyMOL 构建的正常蛋白和分子间相互作用;D:PyMOL 构建的突变蛋白。

图 3 蛋白建模

3 讨 论

本研究报道了 1 例与 NF1 相关的新型 NF1 基

因移码突变(c. 5600delT),该突变将神经纤维蛋白的第 1 867 位氨基酸从异亮氨酸转换为苏氨酸,并提前

引入终止密码子,因此神经纤维蛋白从 2 828 个氨基酸被截断为 1 871 个氨基酸,并且经由 GeneSplitter、NetGene2 和 Human Splicing Finders 预测,该突变影响神经纤维蛋白功能。

根据美国医学遗传学和基因组学学院指南^[4], *NF1* 基因中的突变 c. 5600delT(p. I1867Tfs * 6) 被鉴定为致病性变异,因为(1)ESP 数据库、千人数据库、ExAC 数据库中对照人群中未发现变异(PM2 中等);(2)非重复区框内插入/缺失或终止密码子丧失导致的蛋白质长度变化(PM4 中等);(3)突变与疾病在家系中共分离(在家系中多个患者中检测到此变异)(PP1 支持);(4)多种统计方法预测出突变会对基因或者基因产物造成有害影响,包括保守性预测、进化预测、剪接位点影响等(PP3 支持)。

目前 *NF1* 临床诊断仍基于 1988 年美国国立卫生研究院神经纤维瘤病共识发展会议制订的 *NF1* 诊断标准,并于 2021 修订^[5]。无家族遗传史且符合两项或两项以上临床标准的患者被诊断为 *NF1*;具有家族遗传史且符合一个或多个临床标准的患者被诊断为 *NF1*。尽管此标准广泛用于 *NF1* 的临床诊断,但 *NF1* 存在一些非典型症状,并且一些症状与其他 RAS 相关疾病重叠。例如,如果只出现咖啡斑和雀斑,很大可能诊断 *NF1*,但不能排除 Legius 综合征。因此,基因检测在 *NF1* 诊断方面具有决定性价值。

大约 50% 的 *NF1* 病例是家族遗传,其余病例由 *NF1* 基因突变引起。*NF1* 基因的自发突变率高达 1/10 000,是已知人类基因中突变率最高的基因之一。目前,文献中报道了超过 3 000 种 *NF1* 基因的不同致病突变。美国国家癌症研究所数据库(<https://portal.gdc.cancer.gov/>)显示,*NF1* 基因导致神经纤维蛋白同义、剪接供体、错义、移码、停止增益、剪接受体、内含子、3'UTR 和蛋白质改变变体的替代、缺失和插入突变。

真实世界的 *NF1* 基因研究表明,突变主要是点突变,如碱基替换、移码突变和小缺失。有学者分析 *NF1* 突变类型,截断变异比错义突变更常见,这种突变类型差异在 19 岁以下的患者中尤为明显^[6]。此外,对 30 例 *NF1* 微缺失儿童和青少年的临床特征分析表明,患儿在很小的年纪就常表现出严重的临床症状。*NF1* 基因微缺失患者体内肿瘤总负荷显著高于未缺失患者。此外,30 例 *NF1* 微缺失儿童中有 28 例(93%)患有注意缺陷/多动障碍,有 17 例(56%)患有轻度至中度自闭症^[7]。本研究患者表现出多个牛奶咖啡斑和注意力缺陷/多动障碍。

通过检索文献,总结了近 10 年的 12 篇移码突变的 *NF1* 病例报道^[8-19],共 31 例患者,其中有 8 个家系。确诊患者的年龄从新生儿到 65 岁不等,有 9 例

女性患者,男女比例为 22 : 9。最常见的症状是牛奶咖啡斑(94%),此外,22 例患者(71%)患有神经纤维瘤,15 例患者(48%)腋窝或腹股沟有雀斑。5 例患者(16%)表现出 Lisch 结节,3 例患者(14%)发生了明显的骨损伤。只有 1 例患者(3%)出现视神经胶质瘤。患者还表现为其他肿瘤,如纵隔神经纤维瘤、丛状神经纤维瘤,胃恶性肿瘤和多发性脑错构瘤以及轻度智力发育迟缓。所有病例均显示由移码突变引起的截断变异,这些变异发生在外显子 5、24、25、28、29、32、37、39、42、43、46 和 54 中。

NF1 基因中的新的移码变体 c. 5600delT(p. I1867Tfs * 6)将神经纤维蛋白第 1 867 位氨基酸从异亮氨酸转换为苏氨酸,并将其从 2 818 个氨基酸截断为 1 871 个氨基酸,从而使神经纤维蛋白缺失 C 末端结构域(CTD)和功能性核定位信号(NLS)。NLS 由蛋白激酶 A 和蛋白激酶 C 磷酸化。CTD 的丝氨酸 2576、丝氨酸 2578、丝氨酸 2580 和苏氨酸 2556 被蛋白激酶 A 磷酸化,与 14-3-3 蛋白结合,这降低了神经纤维蛋白的 RAS-GAP 功能。CTD 被 Ser 2808 上的蛋白激酶 C 磷酸化,这对神经纤维蛋白核定位功能非常重要^[20],NLS 靶向非结构蛋白并引导神经纤维蛋白进入细胞核。笔者推测,致病性变体截断神经纤维蛋白的 CTD 和 NLS,影响神经纤维蛋白核定位功能,然后影响其对 RAS 通路的抑制,导致临床症状。

本研究率先在 *NF1* 基因中鉴定出新的移码突变,c. 5600delT(p. I1867Tfs * 6),此突变将神经纤维蛋白的第 1 867 位氨基酸从异亮氨酸变为苏氨酸,并将其从 2 818 个氨基酸截断为 1 871 个氨基酸。本研究扩大了 *NF1* 基因突变库,为遗传咨询和产前诊断提供参考。然而,尚需要进一步的研究来更充分地阐明 *NF1* 基因型与表型的相关性。

参考文献

- [1] FARSCHTSCHI S, MAUTNER V F, MCLEAN A C, et al. The neurofibromatoses[J]. Dtsch Arztebl Int, 2020, 117(20): 354-360.
- [2] HIRBE A C, GUTMANN D H. Neurofibromatosis type 1: a multidisciplinary approach to care[J]. Lancet Neurol, 2014, 13(8): 834-843.
- [3] KOCZKOWSKA M, CALLENS T, CHEN Y, et al. Clinical spectrum of individuals with pathogenic *NF1* missense variants affecting p. Met1149, p. Arg1276, and p. Lys1423: genotype-phenotype study in neurofibromatosis type 1[J]. Hum Mutat, 2020, 41(1): 299-315.

- [4] RICHARDS S, AZIZ N, BALE S, et al. ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology[J]. *Genet Med*, 2015, 17(5):405-424.
- [5] LEGIUS E, MESSIAEN L, WOLKENSTEIN P, et al. Revised diagnostic criteria for neurofibromatosis type 1 and Legius syndrome: an international consensus recommendation[J]. *Genet Med*, 2021, 23(8):1506-1513.
- [6] KANG E, KIM Y M, SEO G H, et al. Phenotype categorization of neurofibromatosis type I and correlation to NF1 mutation types[J]. *J Hum Genet*, 2020, 65(2):79-89.
- [7] KEHRER-SAWATZKI H, KLUWE L, SALAMON J, et al. Clinical characterization of children and adolescents with NF1 microdeletions[J]. *Childs Nerv Syst*, 2020, 36(10):2297-2310.
- [8] VILLA-MORALES J, LOPEZ-MUNOZ E, JUAREZ-MELCHOR D, et al. Characterization of NF1 frameshift mutations in pediatric patients with neurofibromatosis type I[J]. *Genet Mol Res*, 2015, 14(3):8326-8337.
- [9] SU S Y, ZHOU X, PANG X M, et al. NF1 frameshift mutation (c. 6520_6523delGAGA) association with nervous system tumors and bone abnormalities in a Chinese patient with neurofibromatosis type 1[J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15(2):15027527.
- [10] TRIPOLSKI K, FARKAS K, SULAK A, et al. Atypical neurofibromatosis 1 with unilateral limb hypertrophy mimicking overgrowth syndrome[J]. *Clin Exp Dermatol*, 2017, 42(7):763-766.
- [11] LIN X, CHEN H, ZHU W, et al. Neurofibromatosis 1 and X-linked ichthyosis in a patient with a novel frameshift mutation in the NF1 gene[J]. *Eur J Dermatol*, 2016, 26(5):498-499.
- [12] DONG Y Y, ZHANG Y H, LI H W, et al. A novel frameshift mutation in neurofibromin 1 gene in a Chinese family with neurofibromatosis type 1[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2017, 130(5):629-630.
- [13] LIN X, CHEN H, ZHU W, et al. A novel frameshift mutation of the NF1 gene in a Chinese pedigree with neurofibromatosis type 1[J]. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*, 2017, 83(2):231-233.
- [14] CHEN J, GUO B, REN M, et al. A novel NF1 frame-shift mutation c. 703_704delTA in a Chinese pedigree with neurofibromatosis type 1[J]. *Int J Ophthalmol*, 2018, 11(9):1562-1565.
- [15] KOCZKOWSKA M, CHEN Y, CALLEN T, et al. Genotype-phenotype correlation in NF1: evidence for a more severe phenotype associated with missense mutations affecting NF1 Codons 844-848[J]. *Am J Hum Genet*, 2018, 102(1):69-87.
- [16] LIU L, QIN J, LUO H. Whole-exome sequencing identified a novel frameshift mutation of neurofibromin 1 in a Chinese family with neurofibromatosis type 1[J]. *Ann Clin Lab*, 2018, 48(6):808-809.
- [17] YANG J K, WU W J, HE L. Homozygous frameshift mutation in a Chinese family with neurofibromatosis type 1[J]. *J Dermatol*, 2018, 45(5):e134-135.
- [18] XU G, LI M, NIU Y, et al. Identification of a novel NF1 frameshift variant in a Chinese family with neurofibromatosis type 1[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 2019:2721357.
- [19] MICAGLIO E, MONASKY M M, CICONTE G, et al. SCN5A nonsense mutation and NF1 frameshift mutation in a family with Brugada syndrome and neurofibromatosis[J]. *Front Genet*, 2019, 10:50.
- [20] KOLIOU X, FEDONIDIS C, KALPACHIDOU T, et al. Nuclear import mechanism of neurofibromin for localization on the spindle and function in chromosome congression[J]. *J Neurochem*, 2016, 136(1):78-91.

(收稿日期:2023-02-03 修回日期:2023-06-02)

(编辑:石 芸)